

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA**

**QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE SEMENTES E DE  
CALOS CULTIVADOS *in vitro* DE *Passiflora tenuifila* KILLIP  
(PASSIFLORACEAE)**

**Isadora Rosa de Figueiredo**

**Florianópolis – SC  
2018**

**Isadora Rosa de Figueiredo**

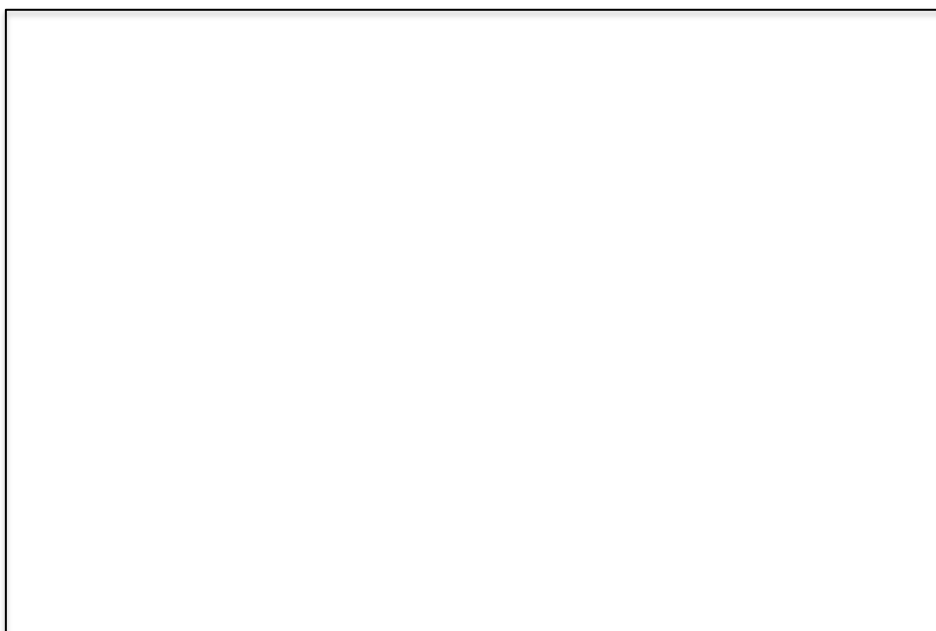
**QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE SEMENTES E DE  
CALOS CULTIVADOS *in vitro* DE *Passiflora tenuifila* KILLIP  
(PASSIFLORACEAE)**

**Projeto de Trabalho de Conclusão de  
Curso apresentado na Universidade  
Federal de Santa Catarina como requisito  
básico para a conclusão do curso de  
Ciências Biológicas.**

**Orientador (a): Ana Maria Viana**

**Florianópolis –SC  
2018**

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, gerado pelo biblioteca universitária  
UFSC.**

A large, empty rectangular box with a thin black border, intended for the user to enter identification data for the work.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dr. Ana Maria Viana, professora a qual sempre tive admiração pelo modo de conduzir as aulas, e dessa forma me fazer escolher a área de Biotecnologia Vegetal. Obrigada por ter dado a oportunidade de iniciar os estudos e aumentar meu conhecimento em relação a esta área, e por ter confiado em mim para a realização deste trabalho, obrigada pela paciência e sua orientação.

Ao Professor Marcelo Maraschin por ter disponibilizado seu laboratório para realizar as análises fitoquímicas das amostras deste trabalho.

À doutoranda Daiane Fiuza Montagner, por toda sua ajuda, sempre disposta a colaborar e auxiliar com paciência em minhas pesquisas. Foram ótimos todos os momentos em salas de laboratório, obrigada por essa nova amizade, gratidão eterna!

À Universidade Federal de Santa Catarina por ter fornecido toda estrutura necessária para a minha formação.

## RESUMO

As espécies silvestres de *Passiflora* brasileiras ainda são pouco estudadas e comercializadas, devido à dificuldade de cultivo. *Passiflora tenuifila* é endêmica do Brasil, ocorre nos biomas Cerrado e Mata Atlântica e estudos preliminares indicaram ser importante fonte de compostos fenólicos, podendo contribuir, de forma relevante, para a indústria alimentícia e farmacêutica, por apresentar compostos bioativos de interesse. Este trabalho teve como objetivos quantificar e analisar o teor de compostos fenólicos totais, flavonóides e atividade antioxidante em extratos de sementes, obtidas de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento e em calos, originados a partir de sementes, cultivados *in vitro*, por diferentes períodos de tempo. Os calos de sementes imaturas foram cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5  $\mu$ M de 2,4-D e 2 g/L de Phytigel e as culturas foram mantidas em sala de crescimento, com temperatura controlada de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas luz, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL ( $22,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e umidade relativa de 70%. As maiores concentrações de fenólicos totais (63,49 mg Eq AG/g MS) e flavonoides (2,08 mg Eq Q/g MS) ocorreram em extratos de sementes de frutos nos estágios iniciais do desenvolvimento, estágios 1 e 2, respectivamente). Nos calos, o maior valor de fenólicos totais foi obtido nas culturas com 30 dias de cultivo (2,42 mg Eq AG/g MS) e para flavonoides, nas culturas com 30 e 45 dias de cultivo (100,92 e 109,49  $\mu$ g Eq Q/g MS, respectivamente). A maior atividade antioxidante, mensurada pelo método de inibição do radical livre DPPH, foi obtida em extratos de sementes de frutos maduros, no estágio 6 (87%) e nos extratos de calos com 30 dias de cultivo (24,54%). Os resultados indicaram que as sementes, imaturas de *P. tenuifila*, nos estágios iniciais do desenvolvimento do fruto, são fontes relevantes de compostos fenólicos, enquanto que, as sementes de frutos maduros são fontes de compostos com atividade antioxidante, apresentando potencial para utilização nas indústrias farmacêutica e alimentícia, na produção e enriquecimento de alimentos funcionais. Os calos originados de sementes apresentaram potencial para a produção de metabólitos secundários, que poderá ser otimizado, em estudos futuros, através da utilização de elicitores bióticos e abióticos.

**Palavras-chave:** *Passiflora*, fenólicos totais, flavonoides, atividade antioxidante, sementes, calos cultivados *in vitro*.

## ABSTRACT

*Passiflora* wild species are not yet marketed due to the difficulty of growing them in the natural environment. *Passiflora tenuifila*, is endemic in Brazil, occurring in the Cerrado and Atlantic Forest. Preliminary studies on this species have shown high levels of phenolic compounds and it may have important contributions to the food and pharmaceutical industry due to the presence of bioactive compounds of interest. This work had as main objective to quantify and analyze the content of total phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity in seed extracts, obtained from fruits at different developmental stages and in calluses extracts, obtained from *in vitro* calluses cultures of *Passiflora tenuifila* at different culture periods. Calluses cultures derived from immature seed were cultured on Murashige & Skoog basal medium supplemented with 88.5 mM sucrose, 2.5  $\mu$ M 2,4-D and 2 g/L Phytigel and the cultures were maintained in growth room, at  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 16 hours photoperiod provided by Philips TDL (22,3  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) fluorescent light tubes and 70% relative humidity. The highest total phenolics (63.49 mg GAE/g DW) and flavonoids (2.08 mg QE/g DW) concentrations were obtained in seed extracts originated from fruits at the early developmental stages 1 and 2, respectively. In calluses, the highest levels of total phenolics were obtained in 30-day-old cultures (2.42 mg GAE/g DW), and the highest levels of flavonoids in 30- and 45-day-old cultures (100.92  $\mu\text{g QE/g DW}$  and 109.49  $\mu\text{g QE/g DW}$ , respectively). The highest antioxidant activity, measured by the DPPH free radical inhibition method, was obtained in seed extracts of mature fruits at stage 6 (87%) and in 30-day-old calluses extracts (24.54%). The immature seeds of *Passiflora tenuifila* at the early fruit developmental stages are relevant sources of total phenolics and seeds from mature fruits are good sources of antioxidant molecules, which demonstrate their potential for use in the pharmaceutical and food industry, for food functional enrichment. Calluses cultures from immature seeds showed potential for secondary metabolite production, which can be optimized by the use of more appropriate biotic and abiotic elicitors in further studies.

**Key words:** *Passiflora*, total phenolics, flavonoids, antioxidant activity, seeds, *in vitro* callus culture.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Atividade antioxidante

AG – Ácido Gálico

ATP – Trifosfato de Adenosina

CA – Catequina

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Eq – Equivalente em

ERMO – Espécies reativas do metabolismo do oxigênio

ES – Extrato seco

FADH<sub>2</sub> – Flavina adenina dinucleotideo reduzida

FRAP – Capacidade redutora do ferro

g – Grama

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG – Glutathiona oxidada

GSH-Rd – Glutathiona-redutase

GSH-Px – Glutathiona-peroxidase

MCW – Metanol, clorofórmio e água

MF – Massa fresca

Mg – Miligrama

mL – Mililitro

MS – Massa seca

MeJA – Metil jasmonato

nm - Nanómetro

NADH – Dinucleotideo de nicotinamida e adenina reduzido

ORAC – Capacidade de absorção de radicais de oxigênio

*P* – Passiflora

PAL – Fenilalanina amônia-liase

SOD – superóxido-dismutase

μg – Micrograma

μl – Microlitro

UV – Ultravioleta

v – Volume

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Flor da espécie *Passiflora tenuifila* Killip.

**Figura 2.** Frutos com sementes a mostra de *Passiflora tenuifila*.

**Figura 3.** Estrutura química básica dos fenólicos.

**Figura 4.** As duas vias de biossíntese dos compostos fenólicos.

**Figura 5.** Estrutura química básica dos flavonoides.

**Figura 6.** Frutos verdes de *P. tenuifila* nos estágios 1, 2, 3 e 5 (da direita para a esquerda) (A,B). Aspectos das sementes de frutos verdes de *P. tenuifila* nos estágios 1, 2, 3 e 5 (C).

**Figura 7.** Frutos maduros de *P. tenuifila* no estágio 6 (A). Sementes de frutos maduros no estágio 6 de *P. tenuifila* (B).

**Figura 8.** Variações nas massas frescas de frutos (A) e de sementes (B) de acordo com os estágios de desenvolvimento dos frutos de *P. tenuifila*.

**Figura 9.** Correlações entre os valores de massa fresca de sementes e de frutos de *P. tenuifila* nos estágios de 1 a 4 (A) e 1 a 5 (B).

**Figura 10.** Variação no teor de água (%) das sementes com os estágios de desenvolvimento dos frutos (estágios 2, 4 , 5 e 6).

**Figura 11.** Teores de fenólicos totais (A), flavonoides (B) e captura de DPPH (C) de extratos de sementes de *P. tenuifila* obtidas de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento.

**Figura 12.** Calos originados a partir do cultivo de sementes de frutos verdes, em desenvolvimento, de *P. tenuifila*.

**Figura 13.** Teores de fenólicos totais (A), flavonoides (B), captura de DPPH (C) e teores de açúcares solúveis totais (D) de extratos de calos de *P. tenuifila* originados de sementes imaturas e cultivados, por 30, 45, 60 e 90 dias.



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Comportamento de espécies e híbridos de *Passiflora* em relação as principais doenças da parte aérea.

**Tabela 2.** Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres.

**Tabela 3.** Principais agentes de defesa antioxidante.

**Tabela 4.** Classes de compostos fenólicos em plantas.

**Tabela 5.** Estrutura química de alguns flavonoides de ocorrência natural em plantas.

**Tabela 6.** Divulgações em periódicos científicos de estudos sobre cultura in vitro de *Passiflora*, de 1990 a 2005.

**Tabela 7.** Massas frescas de frutos e sementes de *P. tenuifila* em diferentes estágios de desenvolvimento obtidas de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento.

**Tabela 8.** Teores de água (%) de sementes de *P. tenuifila* obtidas de frutos em diferentes estágios desenvolvimento.

**Tabela 9.** Teores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em extratos de sementes de *P. tenuifila* obtidas de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento.

**Tabela 10.** Teores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em extratos de calos de *P. tenuifila* originados a partir do cultivo de sementes imaturas.

**Tabela 11.** Razão entre os teores de flavonoides e fenólicos totais em extratos de calos de *P. tenuifila* em diferentes tempos de cultivo.

**Tabela 12.** Valores de coeficientes de correlação linear simples entre diferentes parâmetros analisados em extratos de sementes e de calos de sementes imaturas de *P. tenuifila*.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>4</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>5</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1.Objetivo Geral .....</b>	<b>6</b>
<b>3.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>6</b>
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1 MATERIAIS .....</b>	<b>24</b>
<b>5.2. MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>5.2.1. Separação dos frutos em grupos.....</b>	<b>24</b>
<b>5.2.2. Estabelecimento de culturas de calos a partir do cultivo de sementes imaturas....</b>	<b>26</b>
<b>5.2.3. Análise dos metabólitos primários e secundários .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.3.1 Determinação de compostos fenólicos totais e flavonóides totais.....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.3.2. Açúcares solúveis totais em calos .....</b>	<b>27</b>
<b>5.2.4. Avaliação da atividade antioxidante através da redução do radical livre DPPH..</b>	<b>29</b>
<b>5.2.5. Análise estatística.....</b>	<b>29</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal produtor de maracujá do mundo com uma área de 33 mil hectares destinadas a sua cultura (RUGGIERO, 2000), sendo que a produção brasileira em 2010 foi de 920 mil toneladas, segundo dados da Embrapa. Em quase todos os estados brasileiros o fruto é plantado, os principais produtores estão na região Nordeste, nos estados da Bahia e Ceará, com 42,35% e 25,52%, respectivamente, do total produzido em 2013 de acordo com os dados de produção agrícola municipal (IBGE, 2013).

O gênero *Passiflora* apresenta a maior quantidade de espécies de maracujá dentre os 19 gêneros que formam a família *Passifloraceae*, são cerca de 400 espécies das quais 142 ocorrem no Brasil (JUNQUEIRA *et al.*, 2005). Apesar de possuir uma grande variedade de espécies, as mais cultivadas no país são *Passiflora edulis f. Flavicarpa*, conhecida como maracujá-amarelo ou maracujá-azedo, *Passiflora edulis* (maracujá-roxo) e *Passiflora alata* ou maracujá-doce (SOUZA & MELETTI, 1997), sendo cerca de 95% da produção nacional oriunda do maracujá-azedo. Essas e outras espécies contribuem para a comercialização de frutos no mercado e para o interesse da indústria farmacêutica, por apresentarem compostos químicos medicinais. *Passiflora edulis* apresenta efeito sedativo no suco dos frutos (LORENZIN & MATOS, 2008), *Passiflora alata* é utilizada como planta ornamental e medicinal, devido à extração de substância tranquilizante (passiflorina) das folhas, além de possuir maracugina nas flores e frutos (TEIXEIRA *et al.*, 1994; BRAGA & JUNQUEIRA, 2000), *Passiflora incarnata* pode ser usada como sedativo, analgésico, antiespasmódico e narcótico (DHAWAN *et al.*, 2004).

Algumas espécies que não são cultivadas devido à dificuldade de desenvolvimento em ambiente natural, como *Passiflora tenuiflora* Killip, podem ter contribuições importantes para o melhoramento genético de espécies comerciais, por apresentarem resistência a doenças ou pragas e concentração de componentes químicos de interesse para a indústria alimentícia e farmacêutica (MELETTI *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2009). Assim, essa espécie se torna alvo importante para pesquisa, pois poderia ser utilizada no consumo e no enriquecimento funcional dos alimentos.

Espécies não cultivadas têm sido mantidas *in vitro* mediante técnicas de cultura celular, onde as taxas de biossíntese podem ser aumentadas produzindo uma quantidade maior de metabólitos secundários e atividade antioxidante (CROTEAU *et al.*, 2000), os quais tem sua importância comercial na área alimentar, perfumaria, medicinal, farmácia e agrônômica (SIMÕES *et al.*, 2007). Para haver aumento da produtividade nas culturas celulares,

estratégias como adicionar compostos precursores ao meio de cultivo podem ser utilizadas, além de elicitação das amostras através de estresse químico ou físico. Dentro desse contexto, verifica-se ser de grande importância estudos sobre abordagens biotecnológicas que permitam avaliar a produção de metabólitos secundários e atividade antioxidante em culturas de células de *Passiflora tenuifila*.

## 2. JUSTIFICATIVA

O Brasil desponta como sendo um dos países que apresenta uma das maiores variedades de espécies de *Passiflora* do mundo, apresentando consequentemente, uma grande variabilidade genética dentro do gênero. Porém, ainda poucas espécies silvestres são estudadas com relação à produção de compostos bioativos de interesse, como a *Passiflora tenuifila*, o que torna relevante o desenvolvimento de estudos visando avaliar a produção de metabólitos secundários e a atividade antioxidante de sementes, uma vez que poderiam ser utilizadas no enriquecimento funcional de alimentos, e das culturas *in vitro* de células desta espécie.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente trabalho tem por finalidade verificar se há variação nos níveis de metabólitos secundários e atividade antioxidante em sementes, em diferentes estágios de desenvolvimento e em calos oriundos do cultivo *in vitro* de sementes imaturas de *Passiflora tenuifila*.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os teores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante de extratos de sementes de *Passiflora tenuifila* em diferentes estágios de desenvolvimento
- Verificar os açúcares solúveis totais, fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em extratos de calos oriundos do cultivo *in vitro* de sementes imaturas de *Passiflora tenuifila*.
- Correlacionar a atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos de sementes e de calos.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 A família Passifloraceae

A família Passifloraceae está predominantemente distribuída em regiões tropicais das Américas, Ásia e África, com cerca de 20 gêneros e 600 espécies (SOUZA & LORENZI 2005), no Brasil ocorrem 4 gêneros *Dilkea* Mast, *Mitostemma* Mast, *Ancistrothyrus* Harms e *Passiflora* L. (Killip 1938). Há entre diferentes autores, uma discordância com relação ao número de gêneros e espécies, estima-se que o número de espécies na família Passifloraceae pode variar entre 700 e 520, dependendo do autor. Na região tropical da América e África, Bernacci *et al.* (2003) descreveram a família com 19 gêneros e 530 espécies, para a região Neotropical, 5 gêneros e aproximadamente 400 espécies, sendo que no Brasil, ocorrem quatro gêneros e cerca de 130 espécies.

### 4.2 O gênero Passiflora

Devido à beleza das flores, o gênero *Passiflora* foi possivelmente o gênero das plantas americanas que mais causaram encanto aos olhares colonizadores espanhóis que aportavam na América no século XVI e XVII (CERVI, 1997). O nome popular maracujá vem de maraú-ya, palavra indígena que significa “fruto de sorver” ou “polpa que se toma de sorvo” (ITAL, 1994).

O gênero *Passiflora* L. é o grande representante da família Passifloraceae com o maior número de espécies apresentando grande variedade morfológica, e mais de 530 espécies descritas (ULMER & MACDOUGAL 2004), mais de 90% das espécies do gênero são encontradas na América do Sul (DEGINANI 2001).

No Brasil, tem seu maior domínio nas regiões centro-norte, e seu potencial econômico tem reforçado a dedicação a estudos deste gênero que apresenta um grande número de compostos de interesse para indústrias farmacêuticas, medicinal, alimentícia, ornamental, etc, (Ganga, 2004).

#### 4.3 *Passiflora tenuifila*

Popularmente conhecida como maracujá-alho, é uma espécie silvestre encontrada no Cerrado e Mata Atlântica brasileira, apresenta dormência em suas sementes e possui características facilmente observáveis devido a seu tamanho, flor (Figura 1), cor da polpa, sabor, aroma e fruto com grande quantidade de sementes (PEREIRA *et al.* 2017) (Figura 2).

A espécie ainda não é comercializada no Brasil e há poucos estudos na literatura a seu respeito, voltados principalmente para os componentes físicos e químicos de frutos e folhas, alguns deles realizados por Silveira *et al.* (2015). *Passiflora tenuifila* ainda apresenta grande potencial para melhoramento genético de outras espécies devido à capacidade de resistência a doenças e patógenos, alta resistência à bacteriose, em folhas, e à antracnose em ramos (Junqueira *et al.* 2005) (Tabela 1).



Figura 1. Flor da espécie *Passiflora tenuifila* Killip. Fonte: Brazil Plants. (Acesso em 01/06/2018)



Figura 2. Fruto com sementes de *Passiflora tenuifila*. Fonte: Sozo (2014)



Tabela 1. Comportamento de espécies e híbridos de *Passiflora* em relação as principais doenças da parte aérea, Brasília, 2005.

Espécies e Híbridos	Virose nas	Bacteriose nas	Antracnose nos	Antracnose nos
	folhas	folhas	frutos	ramos
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	AS	AS	S	S
<i>P. alata comercial (CEAGESP)</i>	AS	AS	S	R
<i>P. actinia (Santa Terezinha – MT)</i>	AR	AR	*	R
<i>P. actinia (IAC)</i>	AR	AR	*	R
<i>P. gibetii</i>	AS	AR	R	R
<i>P. serrato-digitata</i>	S	AR	R	R
<i>P. odontophylla</i>	S	R	R	R
<b><i>P. tenuifolia</i></b>	<b>S</b>	<b>AR</b>	<b>S</b>	<b>R</b>
<i>P. edulis f. edulis (Itumirim, MG)</i>	S	R	R	R
<i>P. edulis f. edulis cinza (Taguatinga-TO)</i>	R	R	S	R
<i>P. edulis (Cachoeira Paulista, SP)</i>	AS	*	S	S
<i>P. edulis f. flavicarpa silvestre</i>	AS	R	S	S
<i>P. setacea</i>	R	S	R	R
<i>Fl<sub>E-S</sub> = P. edulis f. flavicarpa (CSB) x (P. setacea)</i>	R	AS	R	R
<i>Fl<sub>E-S</sub> x P. edulis f. flavicarpa (EC-2-O) = RC1<sub>E-S</sub></i>	S	AS	R	R
<i>RC1<sub>E-S</sub> x P. edulis f. flavicarpa (redondão) = RC2<sub>E-S</sub></i>	AS	AS	R	R
<i>RC2<sub>E-S</sub> x P. edulis f. flavicarpa (GA-2) = RC3<sub>E-S</sub></i>	AS	AS	R	R
<i>RC2<sub>E-S</sub> x P. edulis f. flavicarpa (GA-2) = RC4<sub>E-S</sub></i>	AS	AS	*	*
<i>P. nítida (Corumbá-GO)</i>	AS	R	R	R
<i>P. nítida (Itiquira – MT)</i>	S	AR	R	R
<i>P. amethystina (DF)</i>	AS	AS	R	R
<i>P. amethystina (SP)</i>	S	R	R	R
<i>P. coccinea (MT)</i>	R	AS	R	R
<i>Fl<sub>E-CO</sub>-P. edulis f. flavicarpa (CSB) x P. coccinea</i>	R	AS	R	R
<i>Fl<sub>E-CO</sub>-P. edulis f. flavicarpa (CSB) = RC1<sub>E-CO</sub></i>	S	AS	R	R
<i>P. caerulea</i>	S	AR	R	R

\*Sem informação AR – Altamente resistente R – Resistente S – Suscetíveis AS – Altamente suscetíveis . Fonte: (JUNQUEIRA et al. 2005).

#### 4.4 Atividade antioxidante

Muitas das funções fisiológicas humanas podem ser alteradas principalmente devido aos radicais livres e outros oxidantes, evidências tem indicado o papel chave dessas substâncias como sendo os principais responsáveis pelos processos de envelhecimento e também associação com doenças degenerativas como o câncer, declínio do sistema imune e doenças cardiovasculares (SOUSA, SILVA, VIEIRA-JR, & AYRES, 2007). Os radicais livres são moléculas independentes que apresentam um ou mais elétrons não pareados, são altamente instáveis e muito reativos (HALLIWELL, 1994), assim, a importância dos antioxidantes para retardar processos degenerativos acaba sendo de grande valia. Quando há falta de substâncias antioxidantes, podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo, porém a sua disponibilidade é capaz de estabilizar ou desativar as reações dos radicais livres antes que esses ataquem seus alvos biológicos nas células (Sousa *et al.*, 2007).

Os radicais livres podem ser gerados a partir de via endógena ou exógena:

Tabela 2. Fontes endógenas e exógenas de geração de radicais livres.

Endógenas	Exógenas
Inflamações	Dieta
Respiração aeróbica	Cigarro
Peroxisomos	Medicamentos
Enzimas do citocromo P450	Radiações

Fonte: Ferreira & Matsubara (1997).

Compostos antioxidantes presentes em vegetais foram identificados em estudos, em diferentes espécies e partes de plantas, conferindo a saúde humana através de dieta maior qualidade de vida em relação a certas doenças e processos de envelhecimento. Os radicais livres podem ocasionar algumas delas, principalmente as degenerativas, cardiovasculares e ligadas ao envelhecimento, os danos causados no DNA podem desempenhar um papel fundamental na evolução de processos como a mutagênese e carcinogênese (POULSEN *et al.*, 1998). Os principais eventos relacionados aos radicais livres são o envelhecimento, disfunção cerebral, enfisema, mutações, doenças do sistema imune, aterosclerose, diabetes, catarata, esclerose múltipla, inflamações crônicas, artrite e câncer (FERREIRA & MATSUBARA 1997).

Entre as diversas reações químicas que ocorrem nas células, se encontra a formação dos radicais livres via ação catalítica de enzimas, os quais se originam durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e também pela exposição aos fatores exógenos (BIANCHI & ANTUNES, 1999) (Tabela 2). Segundo Cerutti (1991; 1994) devido a produção intracelular e a falta de antioxidantes a concentração dos radicais pode aumentar, causando o chamado estresse oxidativo, podendo ser moderado, ou se produzido em grande quantidade causando danos e até morte celular (ANDERSON, 1996). Na inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG (glutathiona oxidada) e depleção de GSH (glutathiona reduzida). Quando o sistema de oxirredução se encontra íntegro, a GSH deverá ser recuperada. No entanto, com excesso de agentes oxidativos e/ou deficiência do sistema protetor, haverá desequilíbrio entre o consumo de GSH e a produção de GSSG, o que caracteriza o estresse oxidativo. A oxidação é reversível às custas da ação dos compostos antioxidantes.

Segundo Sies (1993), para impedir a indução de danos nas células muitos mecanismos de defesas antioxidantes foram criados a partir da produção contínua de radicais livres no metabolismo celular. Uma definição apropriada para uma substância antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES & STAHL, 1995).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO), nos sistemas aeróbicos é essencial que haja um equilíbrio entre os sistemas de defesa antioxidantes e de agentes óxido redutores (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). As células se protegem através de duas linhas de defesa, uma ocorre antes que haja lesão, constituída por superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathiona-redutase (GSH), glutathiona-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E, a outra linha de defesa ocorre quando já houve lesão, entrando como um reparador da mesma, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e GSH-Px (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

São dois os mecanismos de defesa antioxidante que as células podem apresentar: os mecanismos enzimáticos e os não enzimáticos, conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Principais agentes de defesa antioxidante.

<b>Não Enzimáticos</b>	<b>Enzimáticos</b>
B- caroteno	Superóxido dismutase
Alpha-tocoferol (Vitamina E)	Catalase
Ácido ascórbico (Vitamina C)	NADPH-quinona oxidoredutase
Selênio	Glutathione peroxidase
Clorofilina	Ascorbato peroxidase
L-cisteína	
Curcumina	

Fonte: Adaptado de Sies, 1993.

Atualmente a busca por compostos antioxidantes naturais vem crescendo, e além dos nutrientes essenciais os vegetais e frutos podem apresentar em sua constituição substâncias que contribuem significativamente para este processo. Foram verificados, em estudos, a presença de substâncias antioxidantes de natureza fenólica, com destaque para os polifenóis (HARBONE & WILLIAMS 2000), o gênero *Passiflora* apresenta compostos fenólicos, alcaloides e glicosídeos na constituição de espécies cultivadas e silvestres (DHAWAN *et al.* 2004) . O maracujá mais cultivado no Brasil, dominando mais de 90% dos pomares (MELETTI & BRUKNER, 2001) é *Passiflora edulis*, que tem sua produção direcionada para indústria de sucos e polpas, apresentando substâncias antioxidantes, através de uma composição elevada de carotenoides (SILVA & MERCADANTE, 2002).

A avaliação quantitativa do percentual de sequestro do radical livre DPPH dos extratos de folhas de dezessete espécies de *Passiflora*, realizada por Gomes (2013) indicou que os extratos de *P. capsularis* e *P. tenuifila* apresentaram os maiores valores, 88% e 89,9% respectivamente. PEDROSA (2007) analisou a capacidade antioxidante *in vitro* em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes maduras), de diferentes espécies de *Passiflora*, e, por meio da capacidade de sequestro do DPPH, verificou que a variedade de *Passiflora edulis*, BRS Ouro Vermelho, *Passiflora setacea* (sementes) e *Passiflora tenuifila* (polpa) foram as espécies que mais se destacaram. Ainda, segundo esse estudo, por meio de diferentes ensaios para medir a capacidade antioxidante (capacidade redutora do ferro, FRAP) e capacidade de absorção de radicais de oxigênio, ORAC), *P. tenuifila* apresentou bons resultados nos extratos de pericarpo. Considerando que, em geral, os estudos para medir a capacidade antioxidante utilizam preferencialmente, folhas, casca e polpa de frutos, mas as sementes também podem

mostrar potencial para a produção de componentes bioativos de interesse no gênero *Passiflora*.

#### 4.5 Metabólitos Secundários

Segundo Taiz & Zeiger (2009), no meio em que as plantas vivem há uma série de componentes que podem comprometer seu desenvolvimento e sobrevivência, fatores bióticos como organismos patógenos e herbívoros, e também abióticos como intensidade de luz solar, temperatura, etc. Como as plantas não possuem um meio para se deslocar, a sua proteção acontece devido principalmente a sistemas de defesa que cada espécie possui através da produção dos metabólitos secundários. Inicialmente não eram tidos como substâncias importantes no metabolismo principal das plantas (fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, translocação, etc.), eram considerados até como “resíduos” dessas, mas possuem funções ecológicas importantes nos vegetais agindo diretamente na defesa das plantas contra bactérias, fungos, vírus, insetos e animais herbívoros, assim também como estresse causado por fatores ambientais (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: compostos fenólicos, terpenos e compostos nitrogenados. De acordo com Taiz & Zeiger (2009), os fenólicos apresentam aproximadamente dez mil compostos, entre solúveis em solvente orgânicos, outros são glicosídeos e ácidos carboxílicos solúveis em água e polímeros insolúveis. Os fenólicos são compostos que apresentam um grupo hidroxila funcional e um anel aromático, chamados de grupo fenol (Figura 3):

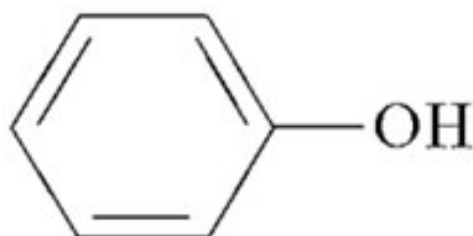


Figura 3 – Estrutura química básica dos fenólicos. Fonte: Taiz & Zeiger (2009).

As plantas apresentam diversas categorias de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzoico e cinâmico), flavonoides, fenóis simples, estilbenos, cumarinas, taninos condensados e hidrolisáveis e ligninas (SOUZA *et al.*, 2007) (Tabela 4). Estes compostos devem sua atividade oxidante às propriedades redutoras e à estrutura química e têm recebido especial atenção, por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (SOUZA *et al.*, 2007).

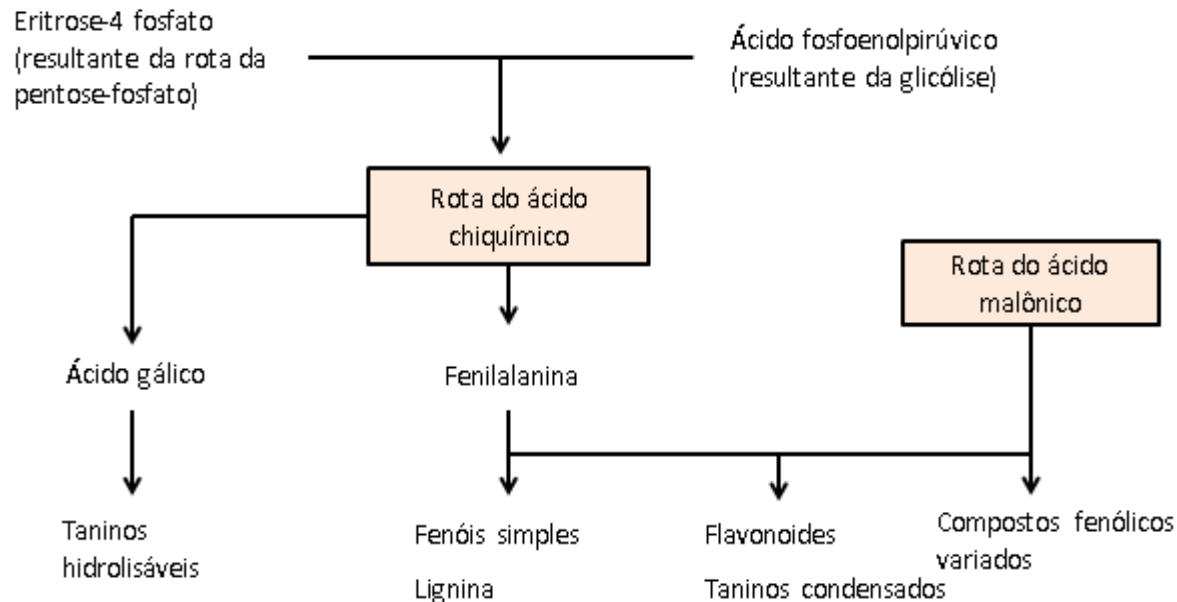
Do ponto de vista metabólico os fenólicos constituem um grupo bastante heterogêneo, apresentam duas rotas básicas principais: a do ácido chiquímico (presente na maioria dos compostos fenólicos vegetais) e a do ácido malônico (menos significativa em plantas vasculares) (Figura 4). De acordo com Taiz & Zeiger (2009), nas plantas vasculares a maioria dos fenólicos são derivados da fenilalanina, produto da rota do ácido chiquímico, que converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota de pentose-fosfato em aminoácidos aromáticos, dos quais tirosina, triptofano e fenilalanina não são produzidos por animais, portanto essenciais a sua dieta. A atividade catalítica da enzima fenilalanina amônia liase (PAL) promove a eliminação de uma molécula de amônia para a formação do ácido cinâmico. A atividade dessa enzima depende de fatores como a disponibilidade de nutrientes, luz e infecções por patógenos, sendo que é aumentada, por exemplo, quando os fatores nutrientes e luz são limitantes. As reações, após a atividade da PAL, levam à adição de grupos hidroxilas ao ácido cinâmico, formando cumarinas e ácido p-cumárico (fenólicos simples e ligninas), outros fenólicos como antocianinas, taninos condensados, isoflavonas e outros flavonoides são também biossintetizados a partir da fenilalanina (TAIZ & ZEIGER, 2009). Na Tabela 4 estão representadas as diferentes classes de compostos fenólicos que as plantas podem produzir:

Tabela 4. Classes de compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C <sub>6</sub>
Ácidos hidroxibenzóicos	C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub>
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub>
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>
Nafitoquinonas	C <sub>6</sub> - C <sub>4</sub>
Xantonas	C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub> - C <sub>6</sub>
Estilbenos, antoquinonas	C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub> - C <sub>6</sub>
Flavonoides, isoflavonoides	C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub>
Lignanas, neolignanas	(C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Biflavonoides	(C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>
Ligninas	(C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Taninos condensados	(C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub> - C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

Fonte: Angelo & Jorge (2007)

Figura 4 – As duas vias de biossíntese dos compostos fenólicos.



Fonte: adaptado de Taiz & Zeiger (2009).

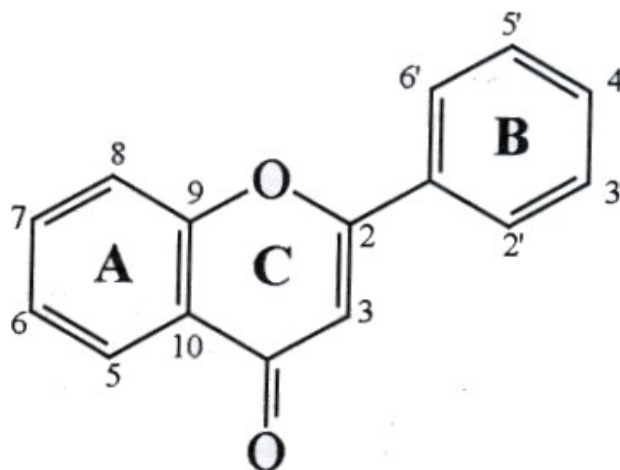
Estudos clínicos, epidemiológicos e *in vitro* vêm apresentando os efeitos biológicos dos compostos fenólicos na dieta, como atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e anticarcinogênica (SBCTA, 2007; SOUSA *et al.*, 2007).

A classe dos flavonoides constitui a maior classe de fenólicos vegetais, e apresentam grande diversidade estrutural, principalmente no grupo das angiospermas, sua quantidade varia dependendo do órgão que se encontra na planta, os flavonoides de flores podem ser diferentes dos que estão em frutos, folhas e galhos (SIMÕES *et al.*, 2000), além de ocorrer variação entre diferentes espécies.

De acordo com Taiz & Zeiger (2009) existem quatro grupos principais de flavonoides: as antocianinas, flavonas, flavonóis e as isoflavonas. As antocianinas são os pigmentos encontrados nos vegetais, responsáveis principalmente pelas cores roxa, vermelha, rosa e azul, enquanto que flavonas e flavonóis atuam protegendo muitas espécies da luz ultravioleta (UV). Das funções atribuídas aos flavonoides estão também a proteção contra microrganismos patógenos, atividade antioxidante, ação alelopática e inibição enzimática (SIMÕES *et al.*, 2000; HARBONE & WILLIAMS, 2000; HEIM, TAGLIAFERRO, BOBILYA, 2002).

A estrutura química básica dos flavonoides (Figura 5) é resultante das duas rotas de biossíntese dos fenólicos, a do ácido chiquímico e do ácido malônico.

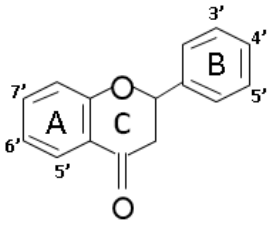
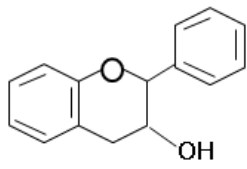
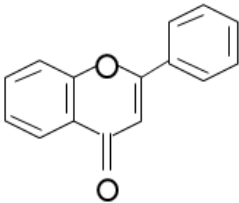
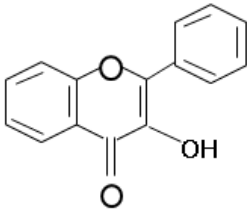
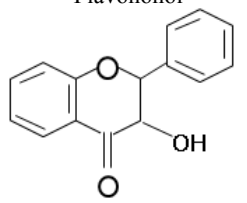
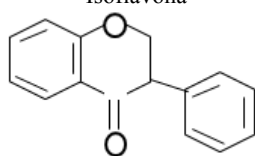
Figura 5 – Estrutura química básica dos flavonoides



A estrutura química de cada flavonoide pode mudar conforme sua atividade bioquímica (Tabela 5), que varia com as substituições incluindo hidroxilações, hidrogenação, metilações, sulfatações, malonilações e glicosilações.



Tabela 5. Estrutura química de alguns flavonoides de ocorrência natural em plantas.

Fórmula estrutural	Flavonoides	Substituições				
		5	6	7	3'	4'
Flavanona						
	Eriodictiol	OH	H	OH	OH	OH
	Hesperitina	OH	H	OH	OH	OMe
	Nariefenina	OH	H	OH	H	OH
Flavanol						
	Catequina	OH	H	OH	OH	OH
	Gallocatequina	OH	H	OH	OH	OH
Flavona						
	Apigenina	OH	H	OH	H	OH
	Crisina	H	H	OH	H	H
	Luteolina	OH	H	OH	OH	OH
Flavonol						
	Kamferol	OH	H	OH	H	OH
	Miricetina	OH	H	OH	OH	OH
	Quercetina	OH	H	OH	OH	OH
Flavononol						
	Taxifolina	OH	H	OH	OH	OH
Isoflavona						
	Daidazina	H	H	OH	H	OH
	Genisteína	OH	H	OH	H	OH
	Gliciteína	OH	OMe	OH	H	OH
	Formononetina	H	H	OH	H	OMe

Fonte: Birt, Hendrich &amp; Wang (2001).

Foram descritos mais de 6000 tipos diferentes de flavonoides (MARCHAND, 2002; YANG *et al.*, 2001), e estes compostos têm merecido importante destaque principalmente pelo seu potencial terapêutico, atividades antioxidantes e anti-inflamatórias (MACHADO, *et al.*, 2008). Nas espécies de *Passiflora*, os flavonoides C-glicosilados, orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina, apresentam ampla distribuição no gênero, sendo os componentes químicos mais citados. A investigação desses flavonoides foi realizada por Gomes (2013), em extratos de folhas de dezessete espécies de *Passiflora*, incluindo *P. tenuifila*.

Sozo (2014), em estudos preliminares, quantificou compostos fenólicos totais e flavonoides em frutos e sementes, em diferentes estádios de desenvolvimento e de calos, com diferentes tempos de cultivo, das espécies de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila*, e observou a influência desses fatores nos resultados. As análises de fenólicos totais realizadas por Pedrosa (2010), em folhas e frutos de espécies de *Passiflora*, mostraram que sementes maduras de *P. setacea* apresentaram teores que foram cerca de 26 vezes maiores, quando comparados às sementes das outras espécies analisadas, *P. alata*, *P. tenuifila* e variedades *P. edulis* variedade BRS.

É necessário ressaltar que a quantidade de metabólitos disponível nas plantas varia entre as espécies, e de acordo com o ambiente em que se encontram, ou seja, desde fatores abióticos naturais como as estações do ano, períodos de chuva e seca, radiação solar, disponibilidade de nutrientes e fatores artificiais como poluentes (CATHERINE; PACKER, 2003; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004), até áreas da biotecnologia para fins de estudo e pesquisa, que utilizam meios de cultura *in vitro* com condições pré-estabelecidas que também alteram o metabolismo das plantas.

#### 4.6 Biotecnologia de Passifloras

As técnicas de biotecnologia aplicadas ao gênero *Passiflora* ainda são mais utilizadas em determinadas espécies, os estudos já realizados são direcionados para as mais comercializadas e cultivadas no Brasil e no mundo, o maracujá amarelo ou azedo, maracujá doce e o maracujá roxo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*, *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* f. *Sims* respectivamente) (DHAWAN *et al.*, 2004) (Tabela 6). Com o melhoramento genético das espécies do gênero objetiva-se a maior produtividade de mudas, resistência maior a doenças causadas por fungos, bactérias (*Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*) e vírus (*Passion fruit woodiness virus*) (FISHER & REZENDE 2008), além da melhoria na

qualidade dos frutos. A diversidade genética presente entre as espécies cultivadas e silvestres de *Passiflora*, se torna essencial para a exploração de suas características e, dessa forma, potencializar a produção e utilização das mesmas.

A micropropagação é uma técnica realizada através de culturas *in vitro* em que a partir de meristemas preexistentes, é utilizada como fonte de células e tecidos, e é aplicada a propagação clonal (DREW, 1997). Entre as outras técnicas *in vitro* utilizadas é possível cultivar células para conservação de espécies, realizar processos de regeneração de plantas e para a produção de metabólitos secundários. No caso do maracujazeiro, ainda poucos estudos sobre culturas de tecido foram realizados, Soares *et al.* (2012) estabeleceram *in vitro* a micropropagação do maracujá silvestre *Passiflora foetida* L.; Santos e colaboradores (2010) analisaram o maracujazeiro-do-sono (*Passiflora setacea* DC.) devido a sua dificuldade de propagação com objetivo de estudar a germinação *in vitro* de suas sementes e determinar um meio mais adequado para o cultivo; foram relatados por Dornelas & Vieira (1994) a proliferação de brotos a partir de ápices caulinares de *Passiflora edulis* flavicarpa, *P. maliformis*, *P. molissima*, *P. giberti*, e *P. amethystina*; e propagação vegetativa de *Passiflora actinia* Hooker (KOCH, 1999). Segundo Vieira & Oliveira (2000) em outros países a micropropagação ainda pode ser adotada de formas diferentes, na Austrália por exemplo um híbrido entre *Passiflora edulis* e *Passiflora edulis* flavicarpa, a cultivar E23 é propagada por microestaquia.

Tabela 6. Divulgações em periódicos científicos de estudos sobre cultura in vitro de *Passiflora*, de 1990 a 2005. Representando a espécie, fonte de explante e concentração de fitorregulador utilizado para indução de regeneração.

Espécie	Fonte de explante	Tipo e concentração de fitorregulador	Referência
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Disco foliar	0,0; 2,2;4,4;6,6 BA ou 0,0;1,1;2,2;3,4 Thidiazuron	Trevisan e Mendes (2005)
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Disco foliar	4,44 BA + 2,32 cinetina	Becerra et al. (2004)
<i>P. edulis var. edulis</i>	Ápices caulinares	22,2 BA	Isutsa (2004)
<i>P. edulis var. flavicarpa</i>	Ápices caulinares	22,2 BA + 11,6 GA3	
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Ápices caulinares	Inibidores (STS e AVG) da ação do etileno	Reis et al. (2003)
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Entrenó	4,4 – 17,7 BA	Biasi et al. (2000)
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Disco foliar	0,0 – 5,3 BA	Otahola (2000)
<i>P. edulis x P. edulis flavicarpa</i>	Cotilédone	10,0 BA + 10% água de coco; transferência para 10,0 NAA	Hall et. al (2000)
<i>P. suberosa</i>	Disco foliar	0,0;2,2 ou 4,4 BA	Monteiro et al. (2000a)
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Segmento nodal	MS ou MSM + 13,3 BA	Monteiro et al. (2000b)
<i>P. caerulea</i>	Folha	10,0 BA + 0,1 IAA	Jasrai e Mudgil (1999)
<i>P. mollissima</i>	Segmento nodal	Várias concentrações e combinações de BA e cinetina	Cancino et al. (1998)
<i>P. edulis flavicarpa</i>	Segmento nodal		
<i>P. giberti</i>	Segmento nodal		
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Hipocótilo	5,0 BA + 2 IAA	Faria e Segura (1997a)
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Folha	2,0 a 20,0 BA + 2,0 IAA	Faria e Segura (1997b)
<i>P. foetida</i>	Endosperma triploide	8,8 BA	Mohamed et al. (1996)
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	Primórdios de brotos	1,0 BA + 1 IBA; transferência para 10,0 BA	Kawata et al. (1995)
<i>P. edulis flavicarpa</i>		8,88 BA + 10% água de coco	Dornelas e Vieira (1994)
<i>P. mollissima</i>	Cotilédone		
<i>P. giberti</i>	Hipocótilo	8,88 BA + 10% água de coco	Dornelas e Vieira (1994)
<i>P. maliformis</i>	Folha		
<i>P. amethystina</i>			

Fonte: Vieira & Carneiro (2004).

O melhoramento genético pode ocorrer via hibridação sexual e somática, e as técnicas aplicadas para gerar variabilidade genética podem ser realizadas a partir de germoplasma de espécies silvestres (resistentes a doenças e pragas e com compostos bioativos de interesse) através de métodos de transformações de plantas e a tecnologia do DNA recombinante (VIEIRA & OLIVEIRA 2005). Visando controlar a bactéria *Erwinia amylovora*, Reynoird *et al.* (1999), transformaram plantas de pêra com o gene da atacina E, isolado de *Hyalophora*

*cecropia*, e conduzida *in vitro* a análise de resistência dos transformantes foi positiva em relação aos não transformantes.

A hibridização somática entre espécies cultivadas e espécies selvagens pode ocorrer através de técnicas de culturas de protoplastos, servindo como outro método para aumentar o fluxo gênico entre as espécies de *Passiflora* (Dornelas & Vieira 1993).

O cultivo *in vitro* de espécies de *Passiflora* com a finalidade de produção de metabólitos secundários é relatado em poucos trabalhos na literatura. A indução de produção de flavonoides em culturas de calos de *Passiflora quadrangularis* foi demonstrada em um trabalho de Antognoni *et al.* (2007), onde o uso de irradiação UV-B e o elicitor metil jasmonato mostraram que a produção de metabólitos secundários pode ser aumentada com tratamentos apropriados de elicitação e cultivo.

A importância da criação de protocolos para o cultivo *in vitro* de espécies de *Passiflora* se faz necessário diante de um baixo número ainda de conjuntos de instruções para a obtenção de bons cultivares, organogênese *in vitro*, cultura de células em suspensão e para produção de metabólitos secundários (PASSOS & BERNACCI 2005), principalmente voltados para as espécies silvestres.

#### 4.7 Aplicações farmacológicas de Passifloras

A medicina popular sempre atribuiu ao maracujá propriedades sedativas e tranquilizantes (CONRADO *et al.*, 2003), Castro & Chemale (1995) apontaram usos de *Passiflora edulis* para convulsões, insônia, pânico e ansiedade, as folhas de *Passiflora Quadrangularis* foram relatadas como contendo efeito calmante, diurético e antifebril (MARTINS 1989), *Passiflora alata* também teve seu uso relacionado a efeito calmante e para insônia por meio de infusão de folhas (CORRÊA JUNIOR *et al.*, 1994).

Os estudos científicos com fim de pesquisar os aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* focam novamente nas mais cultivadas e comercializadas, efeito de extratos de *P. edulis*, *P. alata*, *P. incarnata* e *P. caerulea* acabaram confirmando as ações positivas no controle de alterações nervosas. Romanini e colaboradores (2006) avaliaram a atividade ansiolítica e antidepressiva de extrato de folhas de *Passiflora alata*, confirmando o efeito sedativo da espécie administrado por via oral em camundongos; um extrato etanólico de folhas de *Passiflora incarnata* administrado em ratos protegeu os animais de efeitos pró-convulsivantes do pentilenotetrazol, reduzindo também sua atividade locomotora (SPERONI & MINGHETTI 1988). Estudos realizados com *Passiflora edulis* mostraram que esta possui

efeito depressor do sistema Nervoso Central em roedores (BRUSCHI *et al.*, 2002), efeitos ansiolíticos de extrato metanólico em camundongos (DHAWAN *et al.*, 2001) e mais recentemente, em 2010, Deng e colaboradores verificaram, dependendo da dosagem, que *P. edulis* apresenta efeitos sedativos ou ansiolíticos. Os autores citados acreditam que as substâncias responsáveis por esses efeitos sejam os flavonoides, apesar de não descartar que outros compostos possam ser responsáveis por essa atividade.

Entre outros efeitos diferentes dos que agem no sistema nervoso, atribuídos as espécies de *Passiflora*, estão atividade antifúngica de extratos de *P. edulis* contra *Chrysosporium tropicum*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton* terrestre relatados por Qureshi *et al.* (1997). Estudos que apresentam resultados de atividade antioxidante de *P. alata* e *P. edulis* foram apresentados por Rudnick *et al.* (2007), e também para *P. edulis* (TALCOTT *et al.*, 2003; FERRERES *et al.*, 2007), outras pesquisas realizadas mostraram o efeito anti-inflamatório de *P. edulis* (MONTANHER *et al.*, 2007; VARGAS *et al.*, 2007 e BENICÁ *et al.*, 2007). O uso de folhas de *P. edulis* para tratamento de infecções e inflamações cutâneas é utilizado em algumas regiões do Brasil para cicatrização, e segundo pesquisa, o extrato das folhas da espécie diminuiu inflamações agudas e acelerou o processo de cicatrização na bexiga de ratos (GONÇALVES FILHO *et al.*, 2006). Espécies de *Passiflora* também apresentaram efeitos positivos contra atividade microbiana, ações sobre o sistema respiratório (GOSMANN 2007), e atividade anti-ulcerogênica (NETO, 2015).

Nas sementes de maracujá são encontradas boas fontes de ácidos graxos essenciais, que podem ser exploradas pelas indústrias cosméticas e alimentícias. Martin *et al.* (2000) verificou que ácidos graxos poli-insaturados  $\omega$ -3 e  $\omega$ -3 podem atuar na manutenção de membranas celulares, na transmissão de impulsos nervosos e funções cerebrais. Em um estudo, hamsters alimentados com fibras contidas nas sementes de *Passiflora edulis*, apresentaram significativa redução nos níveis de colesterol total e triglicerídeos, indicando propriedade benéfica através da alimentação (Chau & Huang, 2005).

Não há na literatura muitos trabalhos abordando os aspectos farmacológicos de *Passiflora tenuifila*, pouco conhecida popularmente, ainda não é comercializada no Brasil, embora apresente relevante importância nutricional e medicinal. Ao caracterizar frutos de *P. tenuifila*, Silveira e colaboradores (2016), analisaram compostos bioativos, carotenoides totais e polifenóis extratáveis, e obtiveram resultados relativamente próximos a de outras espécies de maracujazeiro. Vem sendo estudada por apresentar possível propriedade antitremor em idosos

(PEREIRA *et al.*, 2017), dessa forma indicando que a espécie apresenta grande potencial para aplicações farmacológicas.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1 MATERIAIS**

Foram utilizadas sementes removidas de frutos coletados de plantas de *P. tenuifila*, cultivadas em casa de vegetação e estabelecidas a partir de mudas do banco de germoplasma da Embrapa Cerrados Unidade de Planaltina/Brasília/DF.

### **5.2. MÉTODOS**

#### **5.2.1. Separação dos frutos em grupos**

Os frutos de coloração verde foram coletados, e divididos nos seguintes grupos, de acordo com a massa fresca: estágio 1 com 6 g de massa fresca; estágio 2 com 9 g de massa fresca; estágio 3 com 13 g de massa fresca; estágio 4 cerca de 17 g de massa fresca e estágio 5 frutos com 23g de massa fresca (Figura 6). Os frutos de coloração amarela representaram o estágio 6 (Figura 7).

As sementes dos frutos verdes apresentavam coloração branca ou bege clara, nos frutos de classes de tamanho maior (Figura 6C) e os frutos de coloração amarela, considerados os frutos maduros, apresentavam sementes com tegumentos de coloração escura (Figura 7B).

Foram separados 5 frutos por estágio, cujas massas frescas foram determinadas e os valores utilizados para os cálculos da média de massa fresca do fruto, por grupo, e do desvio padrão. Em seguida os frutos foram abertos e determinadas as respectivas massas frescas das quantidades totais de sementes que apresentavam.



Figura 6. Frutos verdes de *P. tenuifila* nos estágios 1, 2, 3 e 5 (da direita para a esquerda) (A,B). Aspectos das sementes de frutos verdes de *P. tenuifila* nos estágios 1, 2, 3 e 5 (C).





Figura 7. Frutos maduros de *P. tenuifila* no estágio 6 (A). Sementes de frutos maduros no estágio 6 de *P. tenuifila* (B)

### 5.2.2. Estabelecimento de culturas de calos a partir do cultivo de sementes imaturas

Para o estabelecimento das culturas de calos foram utilizadas sementes dos estágios 2- 5 e seguidos os procedimentos descritos por Sozo *et al.*, (2016).

Os frutos foram lavados com água da torneira contendo 2-3 gotas de detergente comercial, enxaguados e levados para o fluxo laminar, onde foram imersos, por 10 min em álcool 70%. Em seguida foram excisados o pericarpo e o endocarpo e as sementes, contidas no ovário foram removidas e inoculadas em meio de cultura Murashige & Skoog (1962) (MS, Sigma – Aldrich®), semi-sólido, suplementado com 50 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de

Phytigel (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>), 2,5  $\mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D) e com pH ajustado para 5,8, com 1 N NaOH antes da autoclavagem (121°C, 1kPA, 20 min).

As culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura controlada de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob fotoperíodo de 16 horas, provido por lâmpadas fluorescentes Philips TDL ( $22,3 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) e umidade de 70%.

Após 45 dias de cultivo, amostras de 100 mg dos calos obtidos foram transferidas para o meio de cultura Murashige & Skoog (1962) (MS, Sigma – Aldrich<sup>®</sup>), semi-sólido, suplementado com 88,5 mM de sacarose e 0,2% (m/V) de Phytigel (Sigma – Aldrich<sup>®</sup>), 2,5  $\mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenóxiacético (2,4-D). As culturas foram mantidas nas mesmas condições descritas acima e coletadas após 30, 45, 60 e 90 dias de cultivo para as análises fitoquímicas e de atividade antioxidante.

### **5.2.3 Análise dos metabólitos primários e secundários**

#### **5.2.3.1 Determinação de compostos fenólicos totais e flavonóides totais**

Para a determinação de fenólicos totais utilizou-se 2 g de biomassa fresca de calos e 100 mg de sementes ambos macerados em 10 mL de metanol 80%. Após permanecerem em repouso por 1 hora ao refúgio da luz, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com a metodologia de Schiavon *et al.*, (2012) com modificações. Em um tubo de ensaio foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  do extrato de amostra, 225  $\mu\text{L}$  de Reagente de Folin- Ciocalteau e 2,475 mL de Carbonato de sódio - 2%, as misturas foram agitadas em vórtex e deixadas em repouso no escuro por 1 hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de UV-visível pontual a 750 nm. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada a partir da curva padrão de ácido gálico com concentrações de 5 a 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ( $r= 0,9951$ ). Os resultados serão expressos em mg de ácido gálico por g de massa seca.

Para a determinação de flavonóides totais foram preparados extratos metanólicos com 2g de biomassa fresca de calos maceradas em 5 mL de metanol 80%, e 100 mg de sementes maceradas em nitrogênio líquido e adicionados 10 mL de metanol 80%. Após permanecerem em repouso por 1 hora, ao refúgio da luz, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos. As quantificações foram realizadas de acordo com Zacarias *et al.*, (2007), com

modificações. Em um tubo de ensaio foi adicionado 2,5 mL de etanol PA, 500  $\mu$ L de amostra e 500  $\mu$ L de cloreto de alumínio - 2%. As amostras foram passadas em vórtex e permaneceram em repouso no escuro por 1 hora. Foram realizadas 3 extratos independentes com 5 repetições para sementes e um extrato com 5 repetições para as culturas de calos, ambos foram lidos em espectrofotômetro UV-Vis a 420 nm. Por meio da curva padrão de quercetina nas concentrações de 10 a 200  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> ( $r= 0,9988$ ), os extratos foram quantificados. O teor de flavonoides das amostras foi expresso em equivalentes em  $\mu$ g de quercetina por g de massa seca ( $\mu$ g Eq Q/g massa seca).

### 5.2.3.2 Açúcares solúveis totais em calos

Os açúcares solúveis totais foram quantificados através do método de Shanon (1968 apud Wolfart 2015). Para a extração dos açúcares solúveis totais das amostras de calos foram utilizadas 300 mg de massa fresca. Os calos foram macerados em 2 mL de MCW (metanol, clorofórmio e água), na proporção 15:5:3 (v/v). Os extratos foram centrifugados a 4.000 rpm por 5 minutos, tendo sido coletados os sobrenadantes. O resíduo passou novamente por extração com 2 mL de MCW e foi centrifugado a 4.000 RPM, por 5 minutos. O sobrenadante foi adicionado ao sobrenadante da primeira extração, totalizando 4 mL. Para melhor precisão na quantificação dos açúcares solúveis totais presentes nas amostras, os extratos brutos foram diluídos, sendo que, para os calos com 30 dias de cultivo, utilizou-se 1 mL de extrato em 9 mL de MCW e, nos tempos de 60 e 90 dias a diluição foi de 1mL de extrato para 4 mL de MCW. Alíquota de 4 mL de extrato diluído de cada amostra foi adicionada a 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada, assim obtendo-se uma solução bifásica, na qual a fase superior aquosa de cada extrato foi utilizada para reação. A reação com antrona seguiu as seguintes etapas: 2 mL de antrona a 0,2% (200mg de antrona em 100mL de ácido sulfúrico) foram adicionados a 1 mL da solução aquosa do extrato, a mistura foi homogeneizada em vórtex e em seguida colocada em banho maria, por 3 minutos à temperatura de 100°C (UMBREIT & BURRIS, 1964 *apud* WOLFART, 2015). Após o processo citado acima, a solução foi resfriada, em temperatura ambiente e lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 630 nm. Foram analisados 3 extratos independentes, com 4 repetições cada. A quantidade de açúcares solúveis totais foi determinada através de uma curva padrão de glucose (10 a 200  $\mu$ g/mL)( $r= 0,9969$ ). Os resultados para açúcares solúveis totais foram expressos em mg de glucose por grama de massa seca.

#### 5.2.4. Avaliação da atividade antioxidante através da redução do radical livre DPPH

A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do radical livre orgânico de hidrogênio DPPH (2,2- difenil-1- picrilhidrazil) proposto por Kim *et al.*, (2002). Os extratos utilizados para quantificar os flavonoides foram reutilizados para avaliar o potencial antioxidante do material vegetal estudado. Paralelamente, uma solução metanólica de DPPH 500  $\mu$ L foi preparada de modo que apresentasse 0,5 a 0,6 de absorbância a 530 nm. A reação da atividade antioxidante foi realizada com 2,9 mL de solução de DPPH e 100  $\mu$ L de amostra, após permanecer em repouso por 30 minutos, no escuro, as amostras foram lidas em espectrofotômetro de UV-visível pontual a 530 nm. A atividade antioxidante do DPPH foi calculada pela seguinte equação: % de captura do DPPH =  $[(A_0 - A_a)/A_0] \times 100$ , no qual,  $A_0$  equivale ao valor da absorbância absoluta da solução de DPPH, e  $A_a$  representa o valor da absorbância da atividade antioxidante da amostra.

#### 5.2.5 Análise estatística

Todos os experimentos foram montados de acordo com o delineamento estatístico completamente casualizado. Os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) simples, no caso da comparação entre mais do que dois tratamentos, com separação de médias pelo teste de Tukey, ao nível de 5%; teste *t* de Student e análise de regressão e correlação ao nível de 5%. As análises foram realizadas com o programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 DESENVOLVIMENTO DOS FRUTOS

Os resultados da Tabela 7 e Figuras 8 A, e B indicam que do estágio 1 ao estágio 5 houve incremento progressivo significativo nas massas frescas dos frutos verdes, de  $6,17 \pm 0,25$  g para  $23,08$  g, com queda significativa para  $6,66 \pm 1,17$  g, no estágio 6 (Figura 8 A), indicando ter havido uma desidratação acentuada do fruto.

Quando se analisa as variações no incremento em massa fresca das sementes, em função dos estágios de desenvolvimento dos frutos (Figura 8 B), verifica-se que a massa fresca do total de sementes presentes nos frutos aumentou, do estágio 1 para o estágio 3, de  $1,09 \pm 0,37$  g para  $4,23 \pm 0,44$  g, mas não variou significativamente em comparação com os estágios 4 e 5, permanecendo constante, entre  $4,23 \pm 0,44$  g e  $4,45 \pm 0,43$  g, a partir do estágio 3.

Tabela 7. Massas frescas de frutos e sementes de *P. tenuiflora* obtidas de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento.

Estágios	Massa fresca dos frutos (mg)	Massa fresca das sementes (mg)
1	$6,17 \pm 0,25$ e	$1,09 \pm 0,37$ b
2	$9,07 \pm 0,34$ d	$2,31 \pm 0,61$ b
3	$13,03 \pm 0,65$ c	$4,23 \pm 0,44$ a
4	$17,51 \pm 0,52$ b	$5,33 \pm 0,34$ a
5	$23,08 \pm 1,31$ a	$4,45 \pm 0,43$ a
6	$6,66 \pm 1,17$ e	-

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de 5 frutos por estágio. Letras diferentes, na coluna, indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

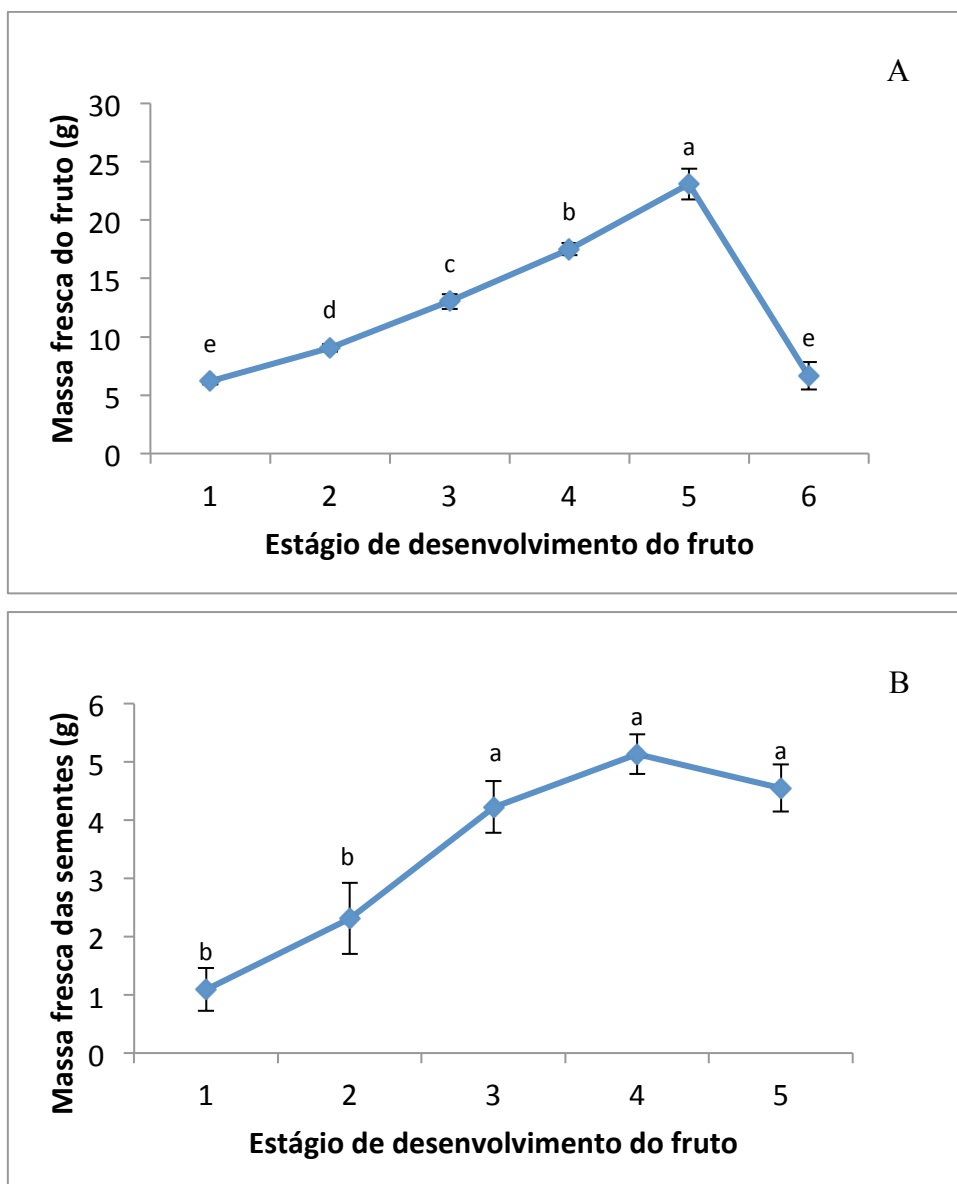


Figura 8. Variações nas massas frescas de frutos (A) e de sementes (B) de acordo com os estágios de desenvolvimento dos frutos de *P. tenuifolia*. Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de 5 frutos por estágio. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A análise de correlação linear entre as massas frescas dos frutos dos estágios 1 – 4 e as respectivas massas frescas das sementes indicaram o valor alto de  $r = 0,936^{**}$  ( $p < 0,01$ ), indicando que o incremento em massa fresca das sementes está fortemente correlacionado com o aumento em massa fresca dos frutos (Figura 9 A).

A análise de regressão não linear simples, incluindo também as massas frescas de frutos e sementes do estágio 5, indicaram que 98,8% dos dados se ajustaram a uma função quadrática polinomial, mostrando haver uma estabilização da massa fresca das sementes a partir do estágio 3 (Figura 9 B)

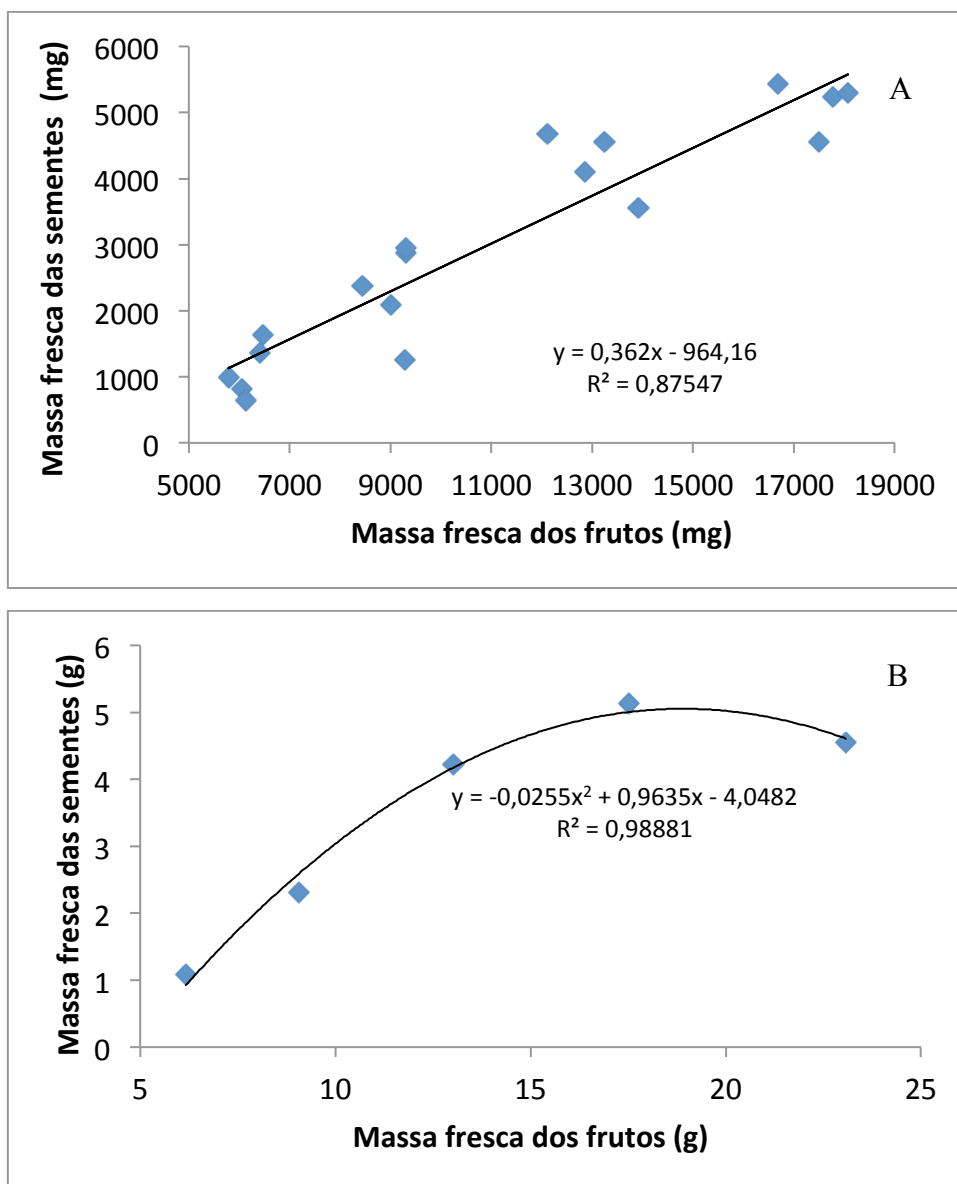


Figura 9. Correlações entre os valores de massa fresca das sementes (A) e frutos (B) de *P. tenuifila* nos estágios de 1 a 4 (A) e 1 a 5 (B).

A determinação do teor de água das sementes foi possível apenas para os frutos nos estágios 2, 4, 5, e 6 e os resultados da Tabela 8 e Figura 10 indicam que não houve variação significativa nos teores de água das sementes dos frutos dos estágios 2, 4 e 5, apesar dos valores terem decrescido de  $88,99 \pm 1,02\%$ , no estágio 2 para  $81,74 \pm 5,83\%$ , no estágio 5. Entretanto, observa-se drástica redução no teor de água das sementes, para  $13,23 \pm 1,01\%$ , no estágio 6.

Tabela 8. Teores de água (%) de sementes de *P. tenuifila* obtidas de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento .

Estágios	Teor de água das sementes (%)
2	88,99 ± 1,02 a
4	83,93 ± 4,18 a
5	81,74 ± 5,83 a
6	13,23 ± 1,01 b

Valores são médias ± desvio padrão de 3 frutos por estágio. Letras diferentes, na coluna, indicam diferença estatística significativa, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

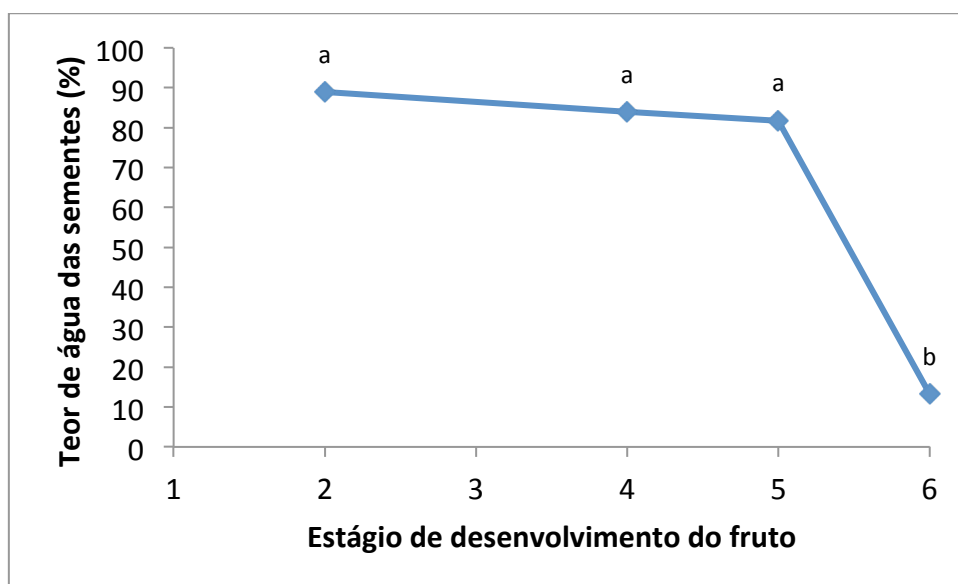


Figura 10. Variação no teor de água (%) das sementes com os estágios de desenvolvimento dos frutos (estágios 2, 4, 5 e 6). Valores são médias ± desvio padrão de 3 frutos por estágio. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 6.2 ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE SEMENTES DE *P. TENUIFILA* OBTIDAS DE FRUTOS EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO

As análises de fenólicos totais foram realizadas com as sementes obtidas dos frutos nos estágios 1,2,3,4 e 6. As análises de flavonoides e atividade antioxidante foram realizadas com frutos nos estágios 2, 3, 4 e 6, devido à não disponibilidade de biomassa em quantidade suficiente de frutos nos estágios 1 e 5.



Os resultados da Tabela 9 e Figura 11 A indicam que os conteúdos de fenólicos totais das sementes dos frutos no estágio 1 foram significativamente maiores ( $63,49 \pm 7,57$  mg Eq AG/g massa seca) em relação aos demais estágios, decrescendo para  $47,55 \pm 3,66$  mg Eq AG/g massa seca), não havendo diferença significativa entre os estágios 2, 3, 4 e 6.

Os maiores níveis de flavonoides foram observados nas sementes de frutos do estágio 2 ( $2,08 \pm 0,082$  mg Eq Q/g massa seca) e também decresceram, progressivamente, nos demais estágios, para  $1,54 \pm 0,11$ ,  $1,46 \pm 0,39$  e  $1,32 \pm 0,019$  mg Eq Q/g massa seca, porém não diferindo significativamente entre si (Figura 11 B). Entretanto, a maior porcentagem de inibição do DPPH foi observada nos extratos de sementes no estágio 6 ( $87,76 \pm 0,57$  %), enquanto que as sementes dos estágios 2, 3 e 4 apresentaram atividade antioxidante que variou entre  $50,32 \pm 6,21\%$  e  $55,80 \pm 1,82\%$  (Figura 11 C).

Tabela 9. Teores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em extratos de sementes de *P. tenuifolia* obtidas de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento.

Estágio s de desenv olvime nto	Razão MS/MF	Fenólicos totais (mg Eq AG/g MS) <sup>x</sup>	Flavonoides (mg Eq Q/g MS) <sup>x</sup>	Flavonoides/ fenólicos totais (%)	Captura de DPPH (%)
1	0,29	$63,49 \pm 7,57$ a	-	-	-
2	0,38	$47,55 \pm 3,66$ b	$2,08 \pm 0,082$ a	4,37	$55,80 \pm 1,82$ b
3	0,33	$33,16 \pm 4,42$ b	$1,54 \pm 0,11$ b	4,64	$50,52 \pm 2,57$ b
4	0,34	$43,60 \pm 0,84$ b	$1,46 \pm 0,39$ b	3,35	$50,32 \pm 6,21$ b
6	0,89	$37,29 \pm 0,48$ b	$1,32 \pm 0,019$ b	3,54	$87,76 \pm 0,57$ a

Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes com 5 repetições cada, por tratamento. Letras diferentes, na coluna, indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). MS= massa seca; MF = massa fresca.

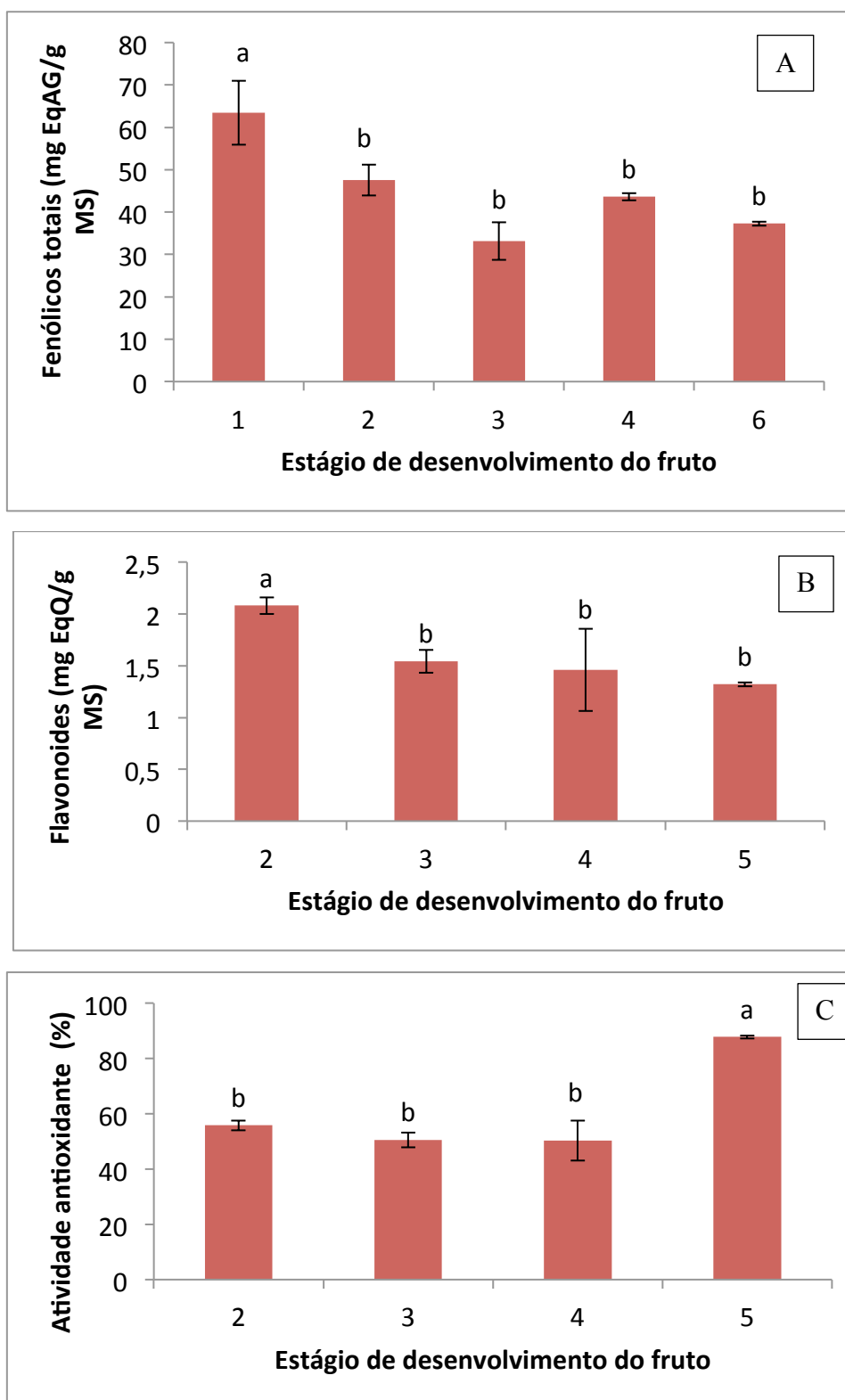


Figura 11. Teores de fenólicos totais (A), flavonoides (B) e captura de DPPH (C) de extratos de sementes de *P. tenuifila* obtidas de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento. Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes com 5 repetições cada. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 6.3 ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS EM EXTRATOS DE CALOS DE *P. TENUIFILA*

A figura 12 mostra o aspecto dos calos utilizados nas análises fotoquímicas, originados a partir do cultivo *in vitro* de sementes de *P. tenuifila*. Os calos apresentavam características embriogênicas e de regeneração de plantas e tiveram a cor alterada com o decorrer do tempo de cultivo.

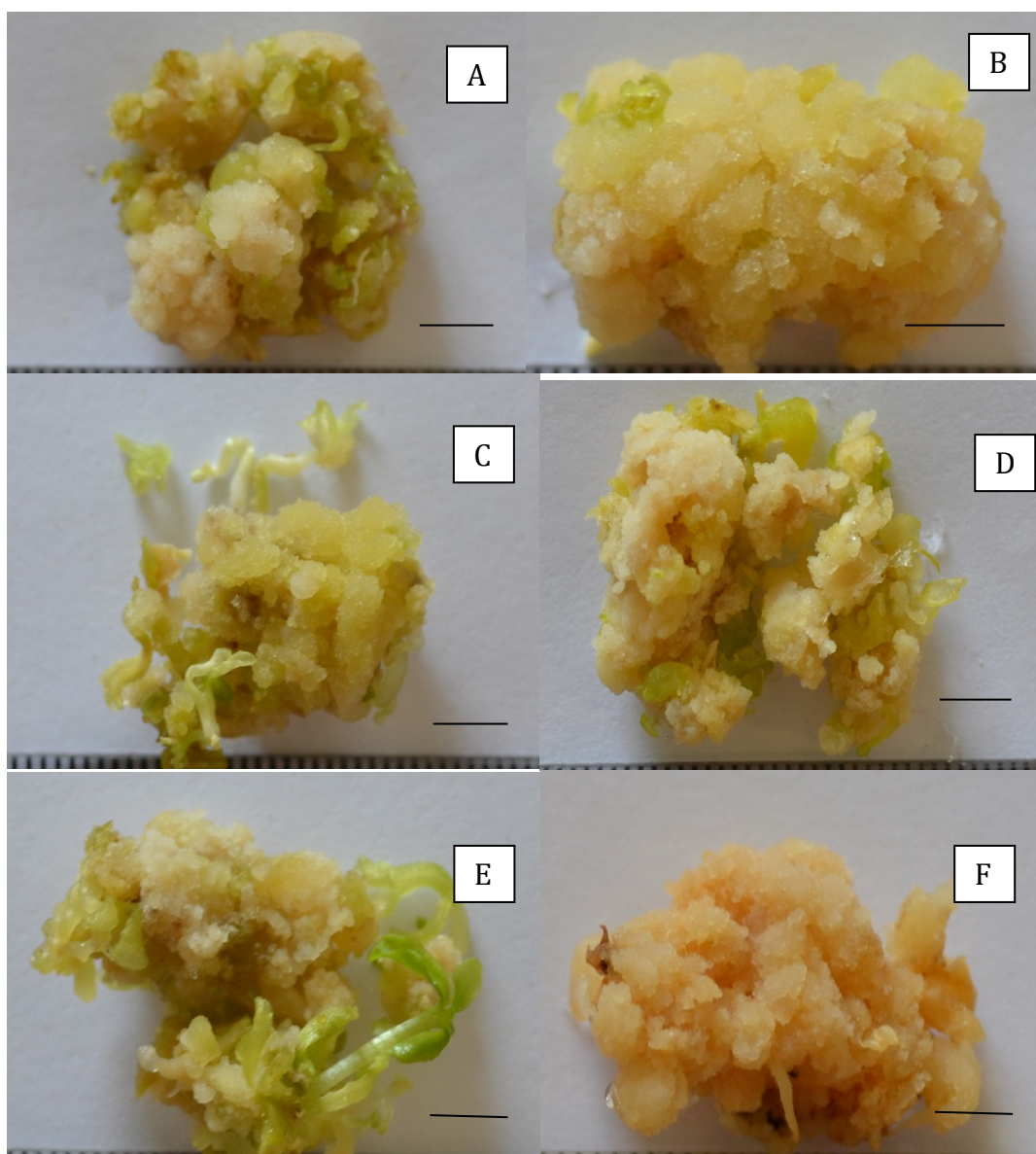


Figura 12. Calos originados a partir do cultivo de sementes de frutos verdes, em desenvolvimento, de *P. tenuifila* em meio de cultura Murashigue & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose, 2,5  $\mu$ M de 2,4-D e 2 g/L de Phytigel, com 45 dias (A-E) e 90 dias (F) de cultivo. Barras= 5 mm

Na Tabela 10 estão representados os valores obtidos para razão entre massa seca e massa fresca dos calos, fenólicos totais, flavonoides, porcentagem de flavonoides em relação aos fenólicos totais e porcentagem de captura do DPPH de extratos de calos, oriundos de sementes imaturas de *P. tenuifila* cultivados, por diferentes períodos de tempo, em meio de cultura MS suplementado com 88,5 mM de sacarose; 2,5  $\mu$ M de 2,4-D e 2 g/L de Phytigel.

Tabela 10. Teores de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em extratos de calos de *P. tenuifila* originados a partir do cultivo de sementes imaturas em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose; 2,5  $\mu$ M de 2,4-D e 2 g/L de Phytigel, por 30, 45, 60 e 90 dias.

<b>Tempo de cultivo (dias)</b>	<b>Razão MS/MF</b>	<b>Fenólicos totais (mg Eq AG/g MS)<sup>x</sup></b>	<b>Flavonoides (<math>\mu</math>g Eq Q/g MS)<sup>x</sup></b>	<b>Açúcares solúveis totais (mg/g MS)</b>	<b>Captura de DPPH (%)</b>
<b>30</b>	0,073	2,42 $\pm$ 0,16 a	100,92 $\pm$ 4,32 a	111,69 $\pm$ 13,22 a	24,54 $\pm$ 0,93 a
<b>45</b>	0,072	1,27 $\pm$ 0,15 b	109,49 $\pm$ 6,08 a	36,32 $\pm$ 1,44 b	23,74 $\pm$ 3,92 a
<b>60</b>	0,055	0,96 $\pm$ 0,05 c	64,99 $\pm$ 2,87 c	20,32 $\pm$ 1,68 b	11,07 $\pm$ 1,21 b
<b>90</b>	0,090	0,77 $\pm$ 0,03 c	81,63 $\pm$ 14 b	32,06 $\pm$ 8,69 b	8,56 $\pm$ 0,74 b

<sup>x</sup>Valores são médias  $\pm$  desvio padrão de 5 repetições (n=5) por tratamento. Letras diferentes, na coluna, indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey (p<0,05). MS= massa seca; MF = massa fresca.

Verifica-se que o maior teor de fenólicos totais foi encontrado em calos de *P. tenuifila* com 30 dias de cultivo (2,42 mg Eq AG/g MS), sendo que as concentrações decresceram significativamente com o decorrer no tempo de cultivo, alcançando os valores mínimos de 0,96 e 0,77 mg Eq/g MS aos 60 e 90 dias de cultivo (Figura 13A).

Os extratos de calos de *P. tenuifila* cultivados por 30 e 45 dias apresentaram as maiores concentrações de flavonoides (100,92 e 109,49  $\mu$ g Eq Q/g MS) em relação aos extratos de calos de 60 e 90 dias (64,99 e 81,63 mg Eq Q/g MS, respectivamente, sendo que o teor de flavonoides dos calos de 90 dias foi significativamente maior em comparação com os calos de 60 dias (Figura 13B).

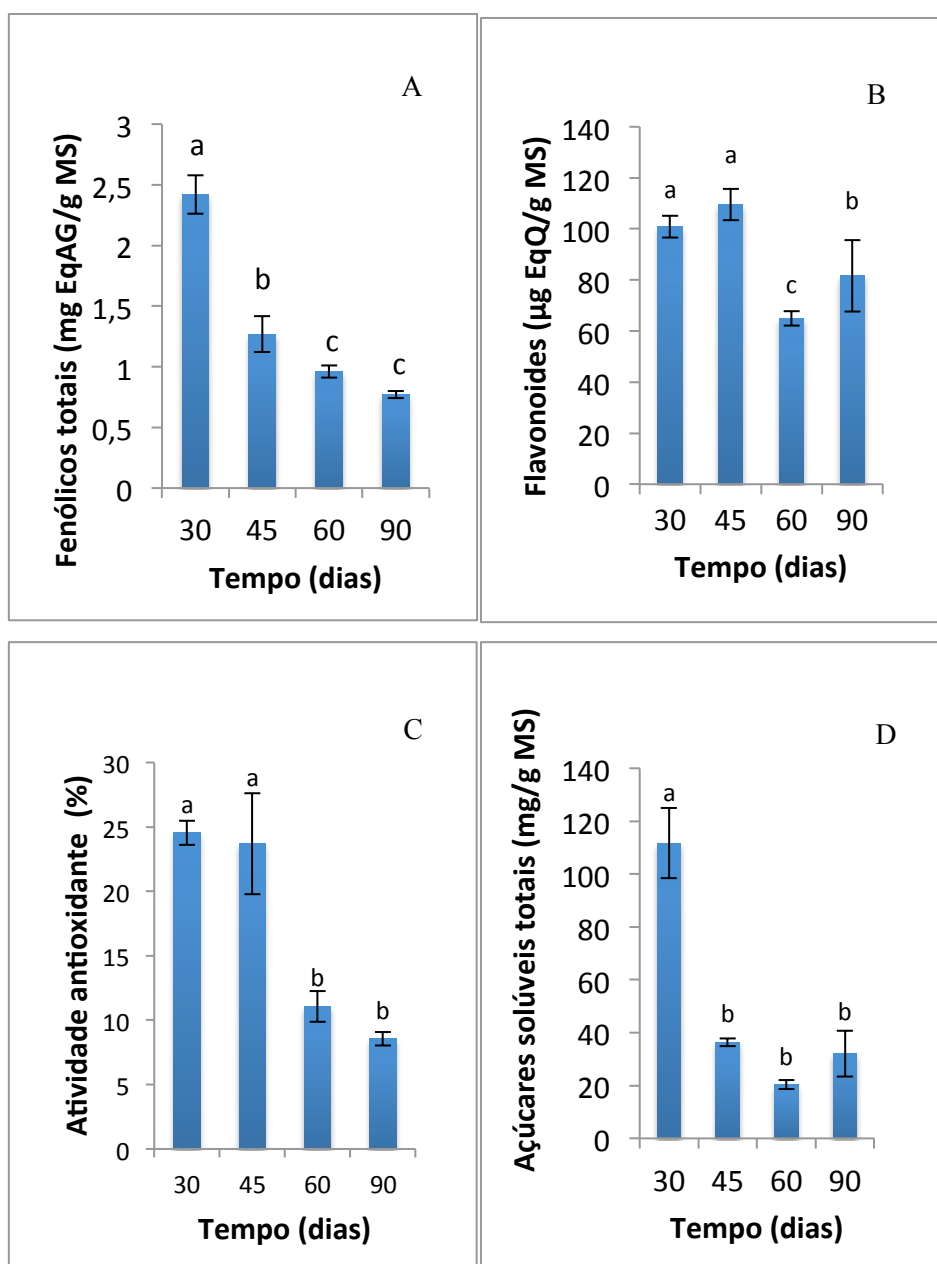


Figura 13. Teores de fenólicos totais (A), flavonoides (B), atividade antioxidante (C) e teores de açúcares solúveis totais (D) de extratos de calos de *P. tenuifila* originados de sementes imaturas e cultivados, por 30, 45, 60 e 90 dias, em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose; 2,5 µM de 2,4-D e 2 g/L de Phytigel. Valores são médias ± desvio padrão de 5 repetições (n=5). Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05). MS= massa seca.

As maiores porcentagens de inibição de DPPH ocorreram em extratos de calos de *P. tenuifila* cultivados por 30 e 45 dias (24,54 e 23,74%, respectivamente) (Figura 13 C). Esses valores foram significativamente maiores do que os obtidos em extratos de calos de 60 e 90 dias (11,07 e 8,56%, respectivamente), que não diferiram significativamente entre si. Os maiores valores de porcentagem de inibição de DPPH observados em extratos de calos de 30 e 45 dias de cultivo (ao redor de  $24,54 \pm 0,93\%$ ) foram, aproximadamente, a metade dos menores valores observados em extratos de sementes de frutos no estágio 4 ( $50,32 \pm 6,21\%$ ).

Observa-se que os extratos de calos de *P. tenuifila* com 30 dias de cultivo apresentaram o maior teor de açúcares solúveis totais (111,69 mg/g MS) em relação aos calos dos demais tempos de cultivo (36,32; 20,32 e 32,06 mg/g MS) (Figura 13 D).

O cálculo da razão entre os metabólicos secundários flavonoides e fenólicos totais foi realizado com o objetivo de verificar se as razões se mantiveram constantes ou se apresentaram variações entre os extratos de calos. Os resultados da Tabela 11 indicam que o menor valor para a razão entre flavonoides e fenólicos totais foi encontrada nos extratos de calos com 30 dias de cultivo (4,17%), mas essa proporção entre flavonoides e fenólicos totais aumentou com o decorrer do tempo de cultivo, atingindo 10,60%, aos 90 dias.

Esses resultados indicam que os níveis de biossíntese de flavonoides, em relação aos fenólicos totais, nos calos variaram, com o tempo de cultivo dos mesmos..

Tabela 11. Razão entre os teores de flavonoides e fenólicos totais em extratos de calos de *P. tenuifila* em diferentes tempos de cultivo, em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose; 2,5  $\mu$ M de 2,4-D e 2 g/L de Phytagel, por 30, 45, 60 e 90 dias.

Tempo de cultivo (dias)	Flavonoides/fenólicos totais (%)
30	4,17 c
45	8,62 b
60	6,77 c
90	10,60 a

<sup>x</sup>Letras diferentes, na coluna, indicam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 6.4 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE OS DIFERENTES PARÂMETROS ANALISADOS EM EXTRATOS DE SEMENTES E CALOS DE *P. TENUIFILA*.

Para verificar se, de um modo geral, os teores de fenólicos totais e flavonoides se correlacionaram com a atividade antioxidante foram calculados os coeficientes de correlação linear simples, expressos na Tabela 12, utilizando-se os resultados obtidos para os extratos de sementes e de calos. Os resultados indicam que, para as sementes de *P. tenuifila* a correlação linear entre fenólicos totais e atividade antioxidante foi baixa e negativa ( $r = -0,229$ ), assim como entre atividade antioxidante e flavonoides (Tabela 12). Apenas a correlação entre fenólicos totais e flavonoides foi positiva, mas moderada ( $r = 0,669$ ).

Já em relação aos calos, os coeficientes de correlação linear entre atividade antioxidante e fenólicos totais e entre atividade antioxidante e flavonoides foram mais altos ( $r = 0,798$  e  $0,867$ , respectivamente). O coeficiente de correlação linear entre fenólicos totais e flavonoides foi próximo do valor observado para as sementes ( $r = 0,559$ ). O coeficiente de correlação linear entre fenólicos totais e açúcares solúveis totais em extratos de calos foram altos ( $r = 0,965^*$ ,  $p < 0,05$ ), enquanto que foram moderados para flavonoides e açúcares solúveis totais e para atividade antioxidante e açúcares solúveis totais ( $r = 0,674$  e  $0,522$ , respectivamente)

Os resultados indicam que em extratos de calos o aumento da atividade antioxidante esteve ligado ao aumento nas quantidades de fenólicos totais e flavonoides, enquanto que nas sementes, a variação na atividade antioxidante esteve fracamente relacionada com as quantidades de fenólicos ou flavonoides, sugerindo que outros grupos de compostos poderiam estar sendo responsáveis pela atividade antioxidante observada.

Tabela 12. Valores de coeficientes de correlação linear simples entre diferentes parâmetros analisados em extratos de sementes e de calos de sementes imaturas de *P. tenuifila* cultivados em meio de cultura Murashige & Skoog suplementado com 88,5 mM de sacarose; 2,5  $\mu$ M de 2,4-D e 2 g/L de Phytigel.

Parâmetros	Sementes	Calos
AA x fenólicos totais	-0,229	0,798
AA x flavonoides	-0,436	0,867
Fenólicos totais x flavonoides	0,669	0,559

AA= atividade antioxidante

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE SEMENTES DE *PASSIFLORA TENUIFILA* EM DIFERENTES ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO

O estudo da variação dos níveis e composição de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em sementes, em diferentes estágios de desenvolvimento, é importante para determinar o período ótimo de acúmulo de compostos de interesse, para o possível aproveitamento das mesmas, como fontes de moléculas bioativas, no enriquecimento nutricional de alimentos (MHAMDI *et al.*, 2010).

O fato dos teores de fenólicos totais e de flavonoides nas sementes de *Passiflora tenuifila* terem diminuído, com o avanço dos estágios de desenvolvimento dos frutos, assim como o teor de água das mesmas, indica terem ocorrido alterações fisiológicas importantes nas sementes, durante o seu desenvolvimento e o processo de maturação dos frutos. A redução significativa nos níveis de água nas sementes, a partir do estágio 5, caracteriza o intenso processo de desidratação que, geralmente, ocorre nas sementes de frutos maduros, para se tornar, adiante, uma unidade de dispersão e assim poder germinar.

Para a aquisição da tolerância à desidratação, vários mecanismos podem ocorrer nas sementes, como o acúmulo de proteínas tolerantes a altas temperaturas, acúmulo de proteínas que são produzidas durante as fases tardias da embriogênese e a produção de moléculas protetoras, como os carboidratos de reserva e de antioxidantes, podendo haver alterações nas paredes celulares (CACCERE *et al.*, 2013). Segundo esses autores, a semente desidratada é fisiologicamente inerte ou quiescente, havendo uma redução característica na taxa de atividade metabólica, decorrente do decréscimo nos intermediários do Ciclo de Krebs e essa queda na atividade respiratória das sementes contribuiria para evitar os processos oxidativos na mitocôndria, levando a um aumento na tolerância à dessecação.

O endosperma da semente apresenta uma alta taxa metabólica, nos estágios iniciais de desenvolvimento e nos estágios mais adiantados do desenvolvimento, a necessidade de nutrientes se torna menos crítica (BRYANT, 1985). Assim, a redução da atividade respiratória, dos carboidratos e, portanto, dos precursores da via de biossíntese dos metabólitos secundários, poderia explicar a queda nos níveis de fenólicos totais e flavonoides, nas sementes de *P. tenuifila*, com o avanço dos estágios de desenvolvimento dos frutos.



Segundo Taiz & Zeiger (2009), os flavonoides, assim como o restante dos fenólicos, são biossintetizados a partir de produtos das rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico, os precursores dessas vias são açúcares que, conforme o avanço nos estágios de desenvolvimento, tiveram seus níveis reduzidos devido a uma menor atividade metabólica das sementes.

O fato de a atividade antioxidante aumentar, nas sementes de frutos maduros de *P. tenuifila* e ser a menor, exatamente nos estágios em que os níveis de fenólicos totais e flavonoides foram os maiores indica que existiu uma correlação negativa entre atividade antioxidante e fenólicos totais e entre atividade antioxidante e flavonoides. Esse resultado é relevante, pois, mostra que a maior atividade antioxidante detectada nas sementes maduras pode ter sido devida a outras moléculas, que não os compostos fenólicos e flavonoides, ou então que novas moléculas, dessas classes de compostos, mais eficientes como antioxidantes, tenham sido produzidas durante o processo de maturação da semente. Apenas a realização de um estudo sobre a composição qualitativa de fenólicos e flavonoides poderia confirmar essa hipótese.

Mhandi *et al.*, (2010), estudando o efeito da época da colheita de sementes de *Borago officinalis* nos níveis e na composição de fenólicos e atividade antioxidante, concluiu que, nessa espécie, houve queda drástica do teor de umidade das sementes, de 90% para 10%, com o processo de maturação, da mesma forma que o observado, no presente trabalho, para as sementes de *P. tenuifila*. Esses autores observaram também, que o nível de fenólicos totais nas sementes mais jovens ( $9,04 \pm 0,8$  mg EAG/g massa seca) era muito próximo do máximo observado nas sementes maduras ( $10,98 \pm 0,97$  mg EAG/g massa seca), mas nas sementes jovens a atividade antioxidante era bem menor ( $CE_{50} 270 \pm 23,33$  µg/ml DPPH) do que a observada nas sementes maduras ( $CE_{50} 32 \pm 1,13$  µg/ml DPPH). Concluíram então que a atividade antioxidante não dependeu do alto teor de fenólicos totais, mas sim da composição de fenólicos, pois conseguiram identificar 9 tipos de fenólicos nas sementes maduras, com aumentos significativos, em relação ao primeiro estágio de desenvolvimento, como o ácido gálico, ácido clorogênico, ácido siríngico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico e sinapico, com a predominância do ácido rosmarínico.

Assim, além da quantificação, a identificação dos compostos torna-se fundamental para o conhecimento dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante. Gomes (2013) investigou a presença de flavonoides (orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina) em dezessete espécies de *Passiflora*, e verificou que a maior concentração do flavonoide isoorientina ocorreu em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. A maior concentração de orientina foi

encontrada em *Passiflora morifolia*. O flavonoide isovitexina foi o de ocorrência mais comum entre as espécies de *Passiflora* e as espécies *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. edulis* f. *edulis* e *P. setacea* apresentaram os melhores resultados na quantificação de flavonoides. Já em extratos de folhas de *Passiflora tenuifila*, Gomes (2013) obteve concentrações de flavonoides mais baixas, menores que o limite de quantificação, porém encontrou as maiores taxas de atividade antioxidante nas espécies de *P. tenuifila* e *P. capsularis*, mostrando, também, nesses estudos não ter havido correlação entre a atividade antioxidante e os níveis de flavonoides.

Ao analisar os níveis de compostos fenólicos, utilizando-se o reagente Folin Ciocalteu e a curva padrão de ácido gálico, em extratos etanólicos de sementes de *Passiflora edulis*, JORGE et al. (2009) obtiveram o resultado de 42,93 mg Eq AG/g massa seca, valor inferior aos obtidos nas sementes imaturas de *P. tenuifila*. Em todas as fases de desenvolvimento das sementes analisadas no presente trabalho, os níveis de fenólicos foram superiores ao estudo realizado por Vieira (2013), com metodologia semelhante, porém utilizando curva padrão de catequina, o qual obteve 12,81 mg Eq CA/g massa seca em extratos de sementes da mesma espécie, porém retiradas de frutos maduros, o que mostra que a fase de desenvolvimento em que a semente se encontra pode influenciar diretamente os níveis de fenólicos totais. Ao analisar a polpa do híbrido de maracujá BRS Ouro vermelho (*Passiflora edulis* Sims), Cohen (2008) obteve valores de 35,64 a 41,47 mg Eq AG/ 100g de amostra. No presente trabalho, as sementes imaturas de *P. tenuifila*, mesmo não tendo sido melhoradas geneticamente, apresentaram valores superiores de fenólicos totais do que os observados por Cohen (2008), nos estágios iniciais do desenvolvimento e similares, nos últimos estágios de desenvolvimento. Em extratos etanólicos de sementes de melão amarelo Malacrida et al., (2007) encontraram valor de 20,90 mg Eq AG/ g massa seca, inferior aos valores obtidos no presente estudo. Estes resultados mostram que as sementes imaturas de *P. tenuifila* apresentaram potencial como fontes de compostos fenólicos.

Um fator que pode alterar os níveis de extração de fenólicos nas amostras é o tipo e a concentração do solvente utilizado na preparação dos extratos, como demonstrado por ROCKENBACH (2000), que analisou o conteúdo de fenólicos totais em bagaços de uva (*Vitis vinifera*), de acordo com o método de Folin Ciocalteu, obtendo os valores de 5,41 Eq AG por 100 g de extrato seco, em etanol 30%; 2,73, em etanol 100% e 7,32, em etanol 50%. Ainda no mesmo estudo, encontrou 5,22, em acetona 30%; 1,82, em acetona 100% e 7,95, em acetona 50%. Em sementes de *Passiflora subpeltata*, Saravanan & Parimelazhagan obtiveram valores de 340,70 mg Eq AG/g extrato seco e 115,70 mg Eq AG/g extrato seco, em extração metanólica e extração com acetona, respectivamente. Portanto, estudos sobre os tipos de

solventes e concentrações mais apropriadas para extrações de sementes de *P. tenuifila* devem ser realizados, com o intuito de otimizar ainda mais os resultados de extração dos compostos fenólicos.

Fatores internos e externos tais como a taxa de luminosidade, estímulos de microrganismos patogênicos e hormonais, que estão ligados a um sistema que regula a abundância de metabólitos secundários nas plantas, podem estar relacionados com as variações nos níveis de compostos fenólicos nas sementes, durante os diferentes estágios de desenvolvimento dos frutos. (LIMA et al., 2007). A concentração maior de fenólicos nas sementes mais jovens pode desempenhar o papel de proteção contra agentes externos, como fungos e predadores, garantindo a sobrevivência e o desenvolvimento do fruto jovem. De acordo com Taiz & Zeiger (2009), muitos fenólicos agem como agentes de defesa contra herbívoros e patógenos, proteção contra radiação ultravioleta, podem atrair polinizadores e dispersores de frutos, e ainda podem ter atividade alelopática, liberando substâncias que impedem o desenvolvimento de plantas alvo, já os flavonoides podem apresentar atividade antimicrobiana e proteção contra raios UV.

A maioria dos estudos voltados para quantificação de fenólicos e flavonoides em espécies de *Passiflora* envolve preferencialmente extratos preparados a partir de folhas, casca e polpa de frutos, por serem fontes mais abundantes desses compostos. Porém, analisando extratos hidroalcoólicos da parte aérea, raízes e sementes de *Canavalia ensiformis*, popularmente conhecida como feijão-de-porco, Souza Filho (2002) verificou que as sementes apresentaram maior atividade alelopática inibitória da radícula e da germinação de sementes de plantas alvo do que as demais partes, capacidade atribuída principalmente aos compostos fenólicos presentes, como ácido clorogênico, genisteína e ácido ferúlico (Mendonça, 2008). Rocha (2017), ao analisar o teor de fenólicos das folhas, pericarpo e sementes de *P. tenuifila* e *P. setacea*, encontrou valores significativamente maiores nas sementes destas espécies quando comparados às outras partes analisadas. Considerando-se que a distribuição de metabólitos secundários não é uniforme nas diferentes partes das plantas, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo (HARBONE, 1972), destaca-se a importância das sementes como fontes potenciais de compostos bioativos de interesse.

De acordo com Mhamdi et al. (2010) as variações na quantidade e na composição dos fenólicos, durante o desenvolvimento da semente, podem significar alterações nas propriedades nutricionais e medicinais das mesmas. Os resultados obtidos para as sementes de *P. tenuifila* indicam que sementes de frutos imaturos são as melhores fontes de compostos fenólicos e flavonoides e as sementes de frutos maduros são as melhores fontes de compostos

com atividade antioxidante, no caso da utilização dessas sementes, como fontes de compostos funcionais, para o enriquecimento nutricional. O fato de a atividade antioxidante ter sido menor nos extratos das sementes de frutos nos estágios mais jovens de desenvolvimento, não significa que não apresentem outras atividades biológicas importantes. Estudos complementares devem ser conduzidos nesse sentido.

## **7.2 ANÁLISES DE FENÓLICOS TOTAIS, FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS DE CALOS DE *PASSIFLORA TENUIFILA* EM DIFERENTES TEMPOS DE CULTIVO**

O fato dos calos de *P. tenuifila*, apresentarem as maiores concentrações de fenólicos totais e açúcares solúveis totais, aos 30 dias de cultivo, mas os maiores valores de flavonoides e atividade antioxidante, aos 30 e 45 dias de cultivo, indicam diferenças no metabolismo de produção de metabólitos secundários pelos calos, em função do tempo de cultivo, com o declínio significativo desses parâmetros aos 60 e 90 dias.

A maior disponibilidade de açúcares solúveis totais, aos 30 dias de cultivo, forneceu, através da via glicolítica, maior aporte de intermediários, utilizados na biossíntese de fenólicos totais e flavonoides, e de moléculas de carbono para ciclo de Krebs, gerador de poder redutor ( $\text{FADH}_2$  e  $\text{NADH}$ ) e fosforilação oxidativa, geradora de ATP, para a sustentação do crescimento celular. Portanto, além de energia metabólica, os carboidratos fornecem, também, os esqueletos de carbono para a biossíntese dos metabólitos secundários (CALDAS *et al.*, 1998).

Assim, o declínio nos níveis de fenólicos e flavonoides, com o avanço do tempo de cultivo dos calos, pode ter sido devido à grande demanda metabólica, representada pelo crescimento celular (divisão e expansão celular), nos estágios iniciais do ciclo de cultivo dos calos, e, pela utilização dos esqueletos de carbono, na construção dos precursores da via de biossíntese da maioria dos compostos fenólicos e flavonoides, levando à depleção das moléculas de carbono nas fases posteriores do ciclo de cultivo. Uma evidência da estreita dependência de açúcares solúveis para a biossíntese de fenólicos totais, nos calos, foi o alto e significativo valor de correlação linear obtido ( $r=0,965^*$ ) entre esses dois parâmetros.

Declínio similar ao observado no presente trabalho, dos níveis de açúcares solúveis totais em calos, com o decorrer do tempo de cultivo, foi relatado por Nogueira et al. (2008), que, realizando análises da composição química de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), oriundos de explantes foliares em diferentes idades, observaram que as

quantidades de aminoácidos, de açúcares solúveis totais e de açúcares redutores, no geral, diminuíram com o passar do tempo de cultivo, porém apresentaram teores máximos no dia da inoculação e nos calos com 60 e 70 dias, num total de 120 dias do ciclo de cultivo. Já Soares (2003), ao analisar teores de açúcares solúveis totais em calos de ingazeiro (*Inga vera*), utilizando explantes foliares, obteve os menores valores, no período de inoculação, indicando que o tipo de explante e a espécie a ser analisada podem interferir no metabolismo dos carboidratos durante o ciclo de cultivo dos calos.

SOZO (2014), ao quantificar os metabólitos secundários e a atividade antioxidante de calos *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* cultivados *in vitro*, por diferentes períodos de tempo, utilizando protocolos semelhantes de extração e dosagem, obteve resultados que, em geral, apresentaram a mesma tendência de variação observada no presente trabalho. Para a espécie de *P. setacea* foram analisados calos oriundos a partir de diferentes tipos de explantes como hipocótilo, nó foliar, raiz e nó cotiledonar, todos avaliados com os mesmos tempos de cultivo, de 45 e 65 dias, e para o cotilédone 45 e 60 dias. Os resultados mostraram que os calos mais jovens (45 dias) apresentaram um resultado positivo mais intenso de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante em relação aos calos de 60 e 65 dias de cultivo, e que, apenas a produção de fenólicos, por calos de no nó foliar, aos 65 dias, foi um pouco maior que aos 45 dias, e a atividade antioxidante no hipocótilo, aos 65 dias, também apresentou leve aumento. Ainda no mesmo estudo, para *P. tenuifila*, foram analisados calos oriundos de sementes imaturas com 50 e 80 dias de cultivo, suplementados com sacarose; com 80 dias, suplementados com frutose, e culturas oriundas do caule com 90 dias de cultivo.

Os resultados obtidos para *P. tenuifila* também apresentaram a mesma tendência do presente trabalho, tendo sido verificado maior atividade de produção, nos calos mais jovens, sendo que os calos analisados por SOZO (2014), cultivados em meios suplementados com diferentes fontes de carbono, não apresentaram diferenças significativas entre si, sugerindo que as idades dos calos influenciaram a produção de metabólitos secundários e a atividade antioxidante.

PERDOMO (2004) analisou a produção de fenólicos, flavonoides e o potencial antioxidante de extratos de calos oriundos de sementes imaturas de *P. tenuifila*, utilizando metodologias, de extração e de dosagem dos compostos, diferentes dos protocolos utilizados no presente trabalho e demonstrou não haver variação entre as concentrações de fenólico totais e atividade antioxidante dos calos de sementes imaturas com 45, 60 e 75 dias de cultivo, mas o maior teor de flavonoides, também ocorreu aos 45 dias de cultivo, decrescendo nos períodos posteriores de cultivo.

Com base nos resultados obtidos por Sozo (2014) foi possível otimizar o tempo de cultivo no protocolo apresentado no presente trabalho, com a realização de experimentos com culturas de calos de *P. tenuifila* mais jovens, de 30 dias de idade. O fato de, já aos 30 dias de cultivo, os calos produzirem os maiores teores de fenólicos, flavonoides e a maior atividade antioxidante, representa uma diminuição no ciclo de cultivo, para a produção de compostos bioativos.

Apesar das concentrações de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos calos de sementes imaturas de *P. tenuifila* terem sido bem menores, do que os teores observados em sementes, é importante salientar o potencial dos mesmos para realizar as vias de biossíntese de compostos fenólicos e de flavonoides, e esse potencial pode ser otimizado. Uma redução nos níveis de metabólitos produzidos *in vitro*, também foi confirmada por OLIVEIRA et al. (2001), em culturas de calos de *Aspidosperma ramiflorum* Muell. Arg, mantidas em meio MS, suplementado com sacarose, em que o acúmulo dos mesmos alcaloides principais, ramiflorina A e ramiflorina B, presentes nos galhos da planta adulta, ocorreu, porém, em níveis, significativamente, menores. .

As variações, em função do tempo de cultivo, nos níveis de fenólicos totais, flavonoides e de atividade antioxidante dos calos de *P. tenuifila* podem estar relacionadas com os níveis de diferenciação celular, em que se encontram as culturas *in vitro*, o que tem sido relatado para muitas espécies e que é importante parâmetro a ser considerado, para o sucesso na produção de metabólitos secundários *in vitro* (VERPOORTE et al., 1993).

O fato dos calos exibirem menores níveis de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante quando comparados às sementes pode estar relacionado com a composição do meio de cultura e com as condições de cultivo. Fatores abióticos, como luminosidade, temperatura e pH são responsáveis por estímulos que contribuem para a variação na produção dessas substâncias, assim como fatores bióticos, microrganismos patogênicos, quitosanas, extratos de proteínas. Estes e outros elicitores podem atuar, reduzindo o tempo necessário para se atingir altas concentrações de determinado composto. ANTOGNONI et al. (2007) induziu a produção de 4 diferentes tipos de flavonoides (orientina, isorientina, vitexina e isovitexina), através de irradiação ultravioleta (UV-B) e elicitação com metil jasmonato (MeJa), em culturas de calos da espécie *Passiflora quadrangularis*, verificando que houve aumento na produção destes compostos e da atividade antioxidante dos calos tratados. Esses resultados sugerem que, formas apropriadas de elicitação e cultivo poderiam, também, aumentar a capacidade de biossíntese dos calos de *P. tenuifila*.

Em estudo realizado com *Artemisia absinthium* L., através de culturas de células em suspensão, Ali et al. (2014) verificaram acúmulos maiores de fenólicos e flavonoides, quando as culturas foram tratadas com MeJa, ácido jasmônico e ácido giberélico. Portanto, é possível que a utilização de culturas de calos, nos tempos de cultivo apropriados e a manipulação, concomitante, de meios contendo elicitores, poderia elevar a produção de metabólitos secundários de interesse e a atividade antioxidante, também nas culturas de calos de *P. tenuifila*.

O teor de flavonoides obtidos nos calos deste trabalho foi superior ao encontrado por SOZO (2014) em polpa de frutos de diferentes estágios de *P. tenuifila* e *P. setacea*, o maior valor verificado nas polpas foi de 0,29 µg Eq Q/g massa seca enquanto que nos calos o teor máximo foi de 100,92 µg Eq Q/g massa seca (aos 30 dias de cultivo), e o valor mínimo obtido foi de 64,99 µg Eq Q/g massa seca, em calos aos 60 dias de cultivo, ainda maior que o resultado máximo detectado nas polpas de frutos. Neste caso, as culturas de calos cultivados *in vitro*, provenientes de sementes de *P. tenuifila* produziram maior teor desses compostos, em menor espaço de tempo, quando comparado com o tempo mais longo, necessário para o desenvolvimento normal dos frutos, o que pode significar uma vantagem na utilização das culturas de calos como fontes de flavonoides e, levando-se em consideração os estudos citados anteriormente, que a produção poderia ser ainda maior, com a elicitação das culturas.

O fato dos calos de sementes imaturas de *P. tenuifila* acumularem fenólicos e flavonoides, mesmo que em pequenas quantidades, confirma a atividade das enzimas fenilalanina amônia liase (PAL) e da chalcona sintase (biossíntese de flavonoides) nos calos. A enzima PAL catalisa a reação de uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER 2006). A atividade da PAL é aumentada por fatores externos como taxa de luminosidade, baixos níveis de nutrientes e ataque de microrganismos. De acordo com Taiz & Zeiger a transcrição do RNA mensageiro que codifica a PAL pode ser desencadeada, por exemplo, pela invasão de fungos, aumentando a quantidade dessa enzima na planta e estimulando a síntese de compostos fenólicos, ou seja, fatores que desencadeiam a atividade desta enzima podem ser incrementados em culturas de calos de *P. tenuifila*, visando o aumento nos níveis de compostos fenólicos.

O declínio da atividade antioxidante dos calos de *P. tenuifila*, com o decorrer do tempo de cultivo, pode estar relacionado com o declínio, concomitante, dos teores de compostos fenólicos e flavonoides, com o decorrer do tempo de cultivo, o que pode ser comprovado pelos valores altos de correlação linear entre atividade antioxidante e os níveis de fenólicos totais ( $r=0,798$ ) e flavonoides ( $r=0,867$ ), obtidos para os calos.

Os compostos fenólicos e flavonoides são substâncias naturalmente antioxidantes e a redução na concentração desses compostos, consequentemente, pode diminuir a atividade antioxidante, como demonstrado em vários trabalhos. Dentre os diferentes genótipos analisados de amoreira-preta (*Rubus*. Sp), com espinho e sem espinho, Vizzoto *et al.*, (2012) demonstraram a máxima atividade antioxidante em seleções e cultivares, com maior teor de compostos fenólicos; Lugato *et al.*, (2012) determinaram o potencial antioxidante de culturas de tecidos de *Passiflora alata* Curtis e observaram que foi diretamente proporcional ao conteúdo de fenólicos totais.

O aumento na produção de compostos com atividade antioxidante pode ser obtido por meio da inclusão de elicitores nas culturas. Brandão *et al.*, (2012) analisaram a influência do ácido salicílico, na produção de metabólitos secundários e atividade antioxidante, em plantas de *Alternanthera tenella* cultivadas *in vitro*, observando que houve aumento na produção de compostos fenólicos e na síntese de betacianinas, e que a porcentagem de inibição do radical livre DPPH foi maior, quando houve exposição ao ácido salicílico.

A menor atividade antioxidante observada em extratos de calos, em relação aos extratos de sementes, poderia ser devida ao fato, não apenas de ter ocorrido a menor biossíntese de fenólicos totais e flavonoides nos calos, como também pode ser que moléculas diferentes, daquelas existentes nas sementes, estejam sendo produzidas pelas culturas de calos de sementes imaturas de *P. tenuifila*. Também é possível que a expressão dos genes, que codificam as enzimas envolvidas nas vias de biossíntese desses compostos e/ou, até mesmo as atividades dessas enzimas estejam minimizadas nos calos.

Estudos complementares também devem ser conduzidos, no sentido de identificar os tipos de compostos fenólicos e flavonoides produzidos pelos calos e pelas sementes, para a construção dos perfis qualitativos de compostos fenólicos e flavonoides, produzidos pelos dois tipos de material vegetal, e determinar, quais moléculas estariam, de fato, envolvidas com a atividade antioxidante das sementes e calos. Apenas através dos estudos, mais aprofundados sobre os mecanismos antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, operantes nas sementes e calos seria possível entender a razão das correlações negativas, nas sementes e positivas, nos calos, entre atividade antioxidante e os níveis de fenólicos totais e flavonoides.



## 8. CONCLUSÕES

Os níveis de fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante variaram, nas sementes, com os estágios de desenvolvimento dos frutos, e nos calos, com o tempo de cultivo.

As sementes de frutos imaturos foram as melhores fontes de fenólicos totais e flavonoides e as sementes dos frutos maduros, as melhores fontes de moléculas com atividade antioxidante, o que destaca o potencial de utilização das sementes no enriquecimento funcional de alimentos e também na indústria farmacêutica, uma vez conduzidos os estudos futuros, no sentido de identificação dessas moléculas e realização dos testes de atividade biológica dos extratos.

A maior atividade antioxidante nas sementes de frutos maduros sugere que outros compostos possam estar envolvidos ou que moléculas de fenólicos, altamente antioxidantes foram produzidas, o que estimula a continuidade dos estudos.

A correlação positiva entre atividade antioxidante e os níveis de compostos fenólicos, detectada nas culturas de calos, apontam para a possibilidade de utilização de estratégias biotecnológicas para a produção de moléculas de interesse, em condições controladas, com a otimização do processo, através da manipulação das condições de cultivo e da utilização de elicitores apropriados.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, M.; ABBASI, B.; ALI, G. **Elicitation of antioxidant secondary metabolites with jasmonates and gibberellic acid in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L.** v. 120, p. 1099-1106, 2014.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão.** Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.), São Paulo, v.66 n.1, 2007. Disponível em: <[http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=en&nrm=iso](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=en&nrm=iso)> Acesso em: 13 fev 2018.
- ANDERSON, D. **Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage.** *Mutation Research*, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- ANTOIGNONI, F.; ZHENG, S.; PAGNUCCO, C.; BARALDI, R.; POLI, F.; BIONDI, S. **Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures.** *Fitoterapia* v.78, n.5, p.345–352, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão.** Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.), São Paulo, v.66 n.1, 2007. Disponível em: <[http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=en&nrm=iso](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552007000100001&lng=en&nrm=iso)> Acesso em: 13 fev 2018.
- ARNON, D. I. **Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*.** *Plant Physiology*. Maryland, v.24, n.1, p. 1-15, Jan. 1949.
- BENICÁ, J. P.; MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTTI, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRODE, T. S. **Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*.** *Food Chemistry*, v. 104, p. 1097-1105, 2007.
- BERNACCI, L. C.; KIRIZAWA, M. **Passifloraceae.** Parte integrante da Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, Instituto de Botânica, São Paulo, v. 3, p. 247-274, 2003.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. (1999). **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** *Revista de Nutrição*, v. 12(2), p. 123–130, 1999.
- BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. **Dietary agents in cancer prevention: flavonóides and isoflavonoids.** *Pharmacology. Therapeutics.*, v. 90, p. 157-177, 2001.
- BRAGA, M. F. & JUNQUEIRA, N. T. V. **Uso potencial de outras espécies do gênero *Passiflora*.** *Informe Agropecuário*, v.21, n. 206, p.72-75, 2000.
- BRANDAO, I. R. **Ácido salicílico como elicitador abiótico no cultivo in vitro de plantas de *Alternanthera tenella* Colla.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.
- BRUSCHI, M. L.; CARDOSO, M. L. C.; MILANI, H. **Avaliação farmacológica de um extrato de *Passiflora edulis* variedade flavicarpa.** *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 23, p. 263-276, 2002.

BRYANT, J. A. **Fisiologia da semente**. Vol 31. São Paulo. Editora Pedagógica e Universitária LTDA, 1985.

CACCERE, R.; TEIXEIRA, S. P.; CENTENO, D. C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; BRAGA, M. R.; **Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase**. *Journal of Plant Physiology* v. 170, p. 791– 800, 2013.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. **Meios nutritivos**. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: EMBRAPA-SPI/EMBRAPA-CNPq, v.1, p.87-132, 1998.

CASTRO, L.O. de.; CHEMALE, V.M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo**. Guaíba: Agropecuária, p. 196, 1995

CATHERINE, A. R.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. 2ed. Nova Iorque/Basel, 2003

CERUTTI, P. A. **Oxidant stress and carcinogenesis**. *European Journal of Clinical Investigation*, Oxford, v.21, n.1, p.1-5, 1991.

CERUTTI, P. A. **Oxy-radicals and cancer**. *Lancet*, London, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.

CERVI, A.C. ***Passifloraceae* do Brasil. Estudo do gênero *Passiflora* L., subgênero *Passiflora***. Fontqueria XLV Madrid. 1997. Disponível em: <bibdigital.rjb.csic.es/PDF/Fontqueria\_45.pdf>. Acesso e: 5 fev. 2018

CHAU, C. F.; HUANG, Y, L. Chau CF, Huang YL 2005. **Effects of the insoluble fiber derived from *Passiflora edulis* seed on plasma and hepatic lipids and fecal output**. *Mol Nutr Food Res* v. 49, p. 786-790, 2005.

COHEN, K. O. **Compostos Fenólicos e vitamina C na polpa extraídos de frutos híbridos de maracujazeiro azedo RBS ouro vermelho**. Comunicado Técnico nº156. ISSN 1517-1465, Planaltina, DF. Dezembro, 2008.

CONRADO, D. J.; FRONZA, T.; PAIVA, R. M.; DRESCH, A. P.; GEREMIAS, D. FENNER, R.; VIANA, A. F.; RATES, S.M.K. **Aspectos químicos, farmacológicos e emprego terapêutico do gênero *Passiflora* (Maracujá)**. *Revista Afargos* v. 15, p. 14-19, 2003.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M. C. **Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas**. 2.ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 162, 1994.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS N. G. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318, 2000.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. **Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos**. *Visão Acadêmica*. Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

FERREIRA, F. R. **Recursos genéticos de Passiflora**. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) Maracujá germoplasma e melhoramento genético. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, p. 40-51, 2005.

DEGINANI, N.B. **Las especies argentinas del género Passiflora (Passifloraceae)**. Darwiniana, v. 39, p. 43-129, 2001.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. **Passiflora: A review update**. J. Ethnopharmacol v. 94, p. 1-23, 2004.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. **Comparative biological activity study on *Passiflora incarnata* and *P. edulis***. Fitoterapia, v. 72, p. 698-702, 2001.

DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L. **Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa***. Journal of Ethnopharmacology, v. 128, p. 148-53, 2010.

DREW, R. A. **Micropropagation of Passiflora species (Passionfruit)**. In: BAJAJ, Y. P. S.(Ed.) Biotechnology in agriculture and forestry: high-tech and micropropagation V. Berlin: Springer Verlag. p.135-149, 1997.

FERRERES, F.; SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; GIL-IZQUIERDO, A **New C-deoxyhexosyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, p. 10187-10193, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. Revista Da Associação Médica Brasileira, v. 43, p. 61-68, 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo, Rev Ass Med Brasil v. 43, p. 61-8, 1997.

FEUILLET, C.; MACDOUGAL, J. M. Feuillet, C. & MacDougall, J.M. **A new infrageneric classification of *Passiflora* L. (Passifloraceae)**. Passiflora, 14: 34-38 v. 13, n. 2, 2003.

FISHER, I. H.; REZENDE, J. A. M. Diseases os Passion Flower (*Passiflora* spp.). Global Science Books , Piracicaba, p. 2-15, 2008.

GANGA, R.M.D.; RUGGIERO, C.; LEMOS, E. G. M.; GRILI, G. V. G.; GONÇALVES, M. M.; CHAGAS, E. A. **Genetic diversity in yellow passion fruit utilizing AFLP molecular markers**. Rev Bras Frut. v. 26, p. 494-498, 2004.

GOMES, S. V. F.; **Aplicação do planejamento Box-Behnken na otimização de método de extração de flavonoides usando extração acelerada com solvents (ASE) e quantificação de marcadores químicos por CLAE-DAD-UV em espécies do gênero *Passiflora***. Tese de doutorado, Universidade Federal da Bahia, 2013.

GONÇALVES-FILHO, A.; TORRES, O. J. M.; CAMPOS, A. C. L.; TÂMBARA-FILHO, R.; ROCHA, L. C. A.; THIEDE, A.; LUNEDO, S. M. C.; BARBOSA, R. E. A.; BERNHARDT, J. A.; VASCONCELOS, P. R. L. 2006. **Efeito do extrato de *Passiflora***

***edulis* na cicatrização da bexiga em ratos: estudo morfológico.** Acta Cirúrgica Brasileira, v. 21, p. 1-6, 2006.

GROSS, J. **Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids.** Nova Iorque: Van Nostrand Reinhold, p. 351, 1991.

GOSMANN, G.; PROVENSÍ, G.; COMUNELLO, L. N.; RATES, S. M. K. **Composição química e aspectos farmacológico de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae).** R. bras. Bioci., Porto Alegre, v. 9, s.1, p. 88-99, abr. 2011

HALLIWELL, B. **Free radicals and antioxidants: a personal view.** *Nutrition Reviews*, Nova Iorque, v. 52, n.8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O. I. **The characterization on antioxidants.** *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 33, n.7, p.601-617, 1995.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. **Advances in flavonoid research since 1992.** *Phytochemistry*, Oxford, v. 55, n. 6, p. 481-504, nov. 2000.

HARBONE, J. B. *Phytochemical ecology.* London: Academic Press, p. 272, 1972.

HEIM, E. K.; TAGLIAFERRO, R. A.; BOBILYA, J. D. **Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships.** *Journal of Nutritional Biochemistry*. v. 13, n.1, p. 572-584, 2002.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. **A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration.** *Canadian Journal Botany* 57: p. 1332-1334, 1979.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal culturas temporárias e permanentes:** vol. 37, p.72. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010\\_Publicacao\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf)> Acesso em: 1 nov. 2017.

JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F.; FALEIRO, F. G.; PEIXOTO, J. R.; BERNATTI, L. C. **Potencial de espécies silvestres de maracujazeiro como fonte de resistência à doenças.** In: FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) *Maracujá germoplasma e melhoramento genético.* Brasília, DF: Embrapa Cerrados, p. 80-108, 2005.

KILLIP, E. P. **The American species of Passifloraceae.** *Publication of Field Museum of Natural History*. Botanical Series, v. 19, p. 1-613, 1938.

KIM, Y. K.; GUO, Q.; PACKER, L. **Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts.** *Toxicology*, v. 172, p. 149-156, 2002.

KOCH, R. C. **Propagação vegetativa de *Passiflora actínia* Hooker por meio da micropropagação e da estaquia semilenhosa.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Paraná, 1999.

KUHNEN, S.; LEMOS P. M. M.; CAMPESTRINI L.H.; OGLIARI J.B.; DIAS P.F.; MARASCHIN M. **Carotenoid and anthocyanin contents of grains of Brazilian maize landraces**. Journal of the Science of Food and Agriculture v. 91, p. 1548-1553, 2010.

LEUENBERGER, F. J.; THOMMEN, H. **Zum Vorkommen von carotinoiden in der Passionsfrucht**. Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung UndForschung, Berlim, v.19, p. 279-282, 1972.

LIMA, L.A.; SIANI, A. C.; BRITO, F. A.; SAMPAIO, A. L. F.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RIEHL, C. A. S. **Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *syzygium cumini*(L.) skeels (myrtaceae)**. Química Nova, vol.30, n.4, pp. 860-864, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

LUGATO, D. S. C. **Cultura De Tecidos E Análise Do Potencial Antioxidante De *Passiflora Alata* Curtis**. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2012.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. **Flavonóides e seu potencial terapêutico**. Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MALACRIDA, C. R.; ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. **Composição química e potencial antioxidante de extratos de sementes de melão amarelo em óleo de soja**. Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 38, n. 4, p. 372-376, out./dez. 2007.

MANDHI, B.; WANNES, W. A.; SRITI, J.; JELLALI, I.; KSOURI, R.; MARZOUK, B. **Effect of harvesting time on phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Borago officinalis* seed extracts**. Industrial Crops and Products v. 31, p. 1-4, 2010

MANICA I, BRANCHER A, SANZONOWICZ C, ICUMA IM, AGUIAR JLP, AZEVEDO JA, VASCONCELLOS MAS & JUNQUEIRA NTV **Maracujá-doce: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado**. 1ª ed. Porto Alegre, Cinco Continentes. p. 198, 2005.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, p. 220, 1998.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZI, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. **Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos**. Rev Nutr v. 19, p. 761-770, 2006

MARCHAND, L. L. **Cancer preventive effects of flavonóides – a review**. Biomed Pharmacother. v. 56, p. 296-301, 2002.

MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D.; BERNACCI, L. C.; PASSOS, I. R. S. **Melhoramento genético do maracujá: passado e futuro**. In: FALEIRO, F. G.; F.G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) Maracujá germoplasma e melhoramento genético. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, p. 80-108, 2005.

MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **Carotenoids from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis*)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 46, p. 4102-4106, 1998.

MENDONÇA, R. **Determinação de aleloquímicos por HPLC/UV-Vis em extratos aquosos de sementes de *Canavalia ensiformis* e estudo da atividade alelopática**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2008.

MONTANHER, A. B.; ZUCOLOTO, S. M.; SCHENKEL, E. P.; FRO-DE, T. S. **Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model**. Journal of Ethnopharmacology, v. 109, p. 281- 288, 2007.

NETO, A. V. **Avaliação da atividade antiúlcera e segurança de uso de *Passiflora setacea* D. C (Passifloraceae) e *Passiflora tenuifila* Killip (Passifloraceae)**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, 2015.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; LIMA, E. C.; SOARES, G. A.; OLIVEIRA, L. M.; SANTOS, B. R.; EMRICH, E. B.; CASTRO, A. H. F. **Curva de crescimento e análises bioquímicas de calos de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss)**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.10, n.1, p.44-48, 2008.

OLIVEIRA, B. J. A.; KOIKE, L.; REIS, F. A. M.; SHEPHERD, S. L. K. **Callus culture of *Aspidosperma ramiform* Muell. Arg.: growth and alkaloid production**. Maringá, v. 23, n. 2, p. 609-612, 2001.

PASSOS, I. R. S.; BERNACCI, L. C. **Cultura de tecidos aplicada à manutenção de germoplasma in vitro e ao melhoramento genético do maracujá (*Passiflora* spp.)**. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) Maracujá germoplasma e melhoramento genético. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, p. 362-384, 2005.

PEREIRA, R. C. A.; SILVEIRA, M. R. S.; COSTA, A. M. **Maracujá Silvestre (*Passiflora tenuifila* Killip): Aspectos agrônômicos e características dos frutos**. Comunicado Técnico nº233. ISSN 1517- 1465, Fortaleza, CE. Outubro, 2017.

PERDOMO, I. C. **Produção de fenólicos, flavonoides e potencial antioxidante de extrato de calos de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae) cultivados in vitro**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. **Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion**. European Journal of Cancer Prevention, Oxford, v.7, n.1, p. 9-16, 1998.

QURESHI, S.; RAI, M. K.; AGRAWAL, S. C. **In-vitro evaluation of inhibitory nature of extracts of 18 plant species of *Chhindwara* against 3 keratinophilic fungi**. Hindustan Antibiotics Bulletin, v. 39, p. 56-60, 1997.

REYNOIRD, J. P.; MOURGUES, F.; NORELLI, J.; ALDWINCKLE, H. S.; BRISSET, M. N.; CHEVREAU, E. **First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the attacinE gene from *Hyalophora cecropia***. Plant Science, v. 149, p. 23-31, 1999.

ROCHA, G.; **Quantificação de metabólitos primários, secundários e atividade antioxidante em frutos e folhas de *Passiflora tenuifila* Killip e *Passiflora setacea* DC (Passifloraceae).** Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Santa Catarina. 2017.

ROMANINI, V. R.; MACHADO, M. W.; BIAVATTI, M. W.; OLIVEIRA, R. M. W. **Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa de folhas de *Passiflora alata* Curtis em camundongos.** Maringá, v. 28, p. 159-164, 2006.

RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M. R.; PEREIRA, T. V.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. **Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts.** Food Chemistry, v. 100, p. 719-724, 2007.

RUGGIERO, C., **Situação da cultura do maracujazeiro no Brasil.** Informe Agropecuário, vol. 21:5-9, 2000. Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da UFSC, p. 1102, 2007.

SANTOS, F. C.; RAMOS, J. D.; PASQUAL, M.; REZENDE, J. C.; SANTOS, F. C.; VILLA, F. **Micropropagação do maracujazeiro-do-sono.** Ver. Ceres, Viçosa, v. 57, n. 1, p. 112-117, jan/fev, 2010.

SARAVANAN, S.; PARIMELAZHAGAN, T. **Total phenolic content, free radical scavenging and antimicrobial activities of *Passiflora subpeltata* seeds.** Jornal of Applied Pharmaceutical Science, v. 3, p. 67-72, 2013.

SILVA, S. R. D.; MERCADANTE, A. Z. **Composição de carotenóides de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* F flavicarpa) in natura.** Food Science and Technology, v. 22, p. 254-258, 2002.

SIES, H. **Strategies of antioxidant defence.** Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SIES, H., STAHL, W. **Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants.** *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Florianópolis: Editora da UFSC. 2ª ed, 2000.

SILVA, S. R.; MERCADANTE, A. Z. **Composição de carotenoides de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* flavicarpa) in natura.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 22, p. 254-258, 2002.

SILVEIRA, M. R. S.; GOMES, W. K. S.; SOUSA, A. E. D.; ALMEIDA, M. L. B.; FREITAS, W. E. S., BRAGA T. R.; OIRAM FILHO, F.; PEREIRA, R. C. A., SILVA, L. R. **Caracterização de frutos de maracujazeiro silvestre (*Passiflora tenuifila*),** 2015.



SOARES, W. S.; RÊGO, M. M.; BARROSO, P. A.; NASCIMENTO, K. S.; FERREIRA, K. T. **Estabelecimento in vitro e micropropagação de maracujá silvestre (*Passiflora foetida* L).** Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.esp., p.138-142, 2012.

SOARES, G.A. **Aspectos do cultivo in vitro do ingazeiro (*Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn.)**. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras 90p, 2003.

SOUSA, J. S. I. & MELETTI L. M. M. **Maracujá: espécies, variedades e cultivos**. 1ª ed. Piracicaba, Editora FEALQ. p. 179p, 1997.

SOUSA, C.; SILVA, H.; VIEIRA-JR, G.; AYRES, M. Sousa, C., Silva, H., Vieira-Jr, G., & Ayres, M. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. Química Nova, 2007.

SOUZA FILHO, A. P. S. **Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólico de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*)**. Planta Daninha, v. 20, n. 3, p. 357-364, 2002.

SPERONI, E.; MINGHETTI, A. **Neuropharmacological activity of extract from *Passiflora incarnata***. Planta Medica v. 54, p. 488-491, 1988.

SOZO, J. S.; **Perfis de metabólitos secundários e atividade antioxidante de frutos, sementes e calos cultivados in vitro de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina. 2014.

STAHL, W., SIES, H. **Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids**. Diabetes, Nova Iorque, v. 46, p.14-18, 1997.

TALCOTT, S. T.; PERCIVAL, S. S.; PITTET-MOORE, J.; CELORIA, C. **Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*)**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, p. 935-941, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TEIXEIRA, C. G.; CASTRO, J. V.; TOCCHINI, R.P.; NISIDA, A.L.A.C.; HASHIZUME, T.; MEDINA, J.C.; TURATTI, J.M.; LEITE, R.S.S.F.; BLISKA, F.M.M.; GARCIA, A.E.B. **Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2.ed. Campinas: ITAL, p. 267, 1997.

ULMER, T. & MACDOUGAL, J. M. ***Passiflora: passionflowers of the world***. Portland Oregon: Timber Press. p. 430 , 2004.

VARGAS, A. J.; GEREMIAS, D. S.; PROVENSÍ, G.; FORNARI, P. E.; REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHENCKEL, E. P.; FRO-DE, T. S. ***Passiflora alata* and *Passiflora edulis* spray-dried aqueous extracts inhibit inflammation in mouse model of pleurisy**. Fitoterapia, v. 78, p. 112- 119, 2007.

VERPOORTE, R.; HEIJDEN, R. V.; SCHRIJPEMA, J. **Plant Cell Biotechnology for production of alkaloids: present status and prospects**. J. Nat. Prod., Downers Grove, v. 56, no.2, p.186-207, 1993.

VIZZOTTO, M.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, M. C.; FETTER, M. R. **Teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em diferentes genótipos de amoreira-preta (*Rubus* sp.)**. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 34, n. 3, p. 853-858, 2012.

VIEIRA, M. L. C.; OLIVEIRA, E. J.; MATTA, F. P.; PÁDUA, J. G.; MONTEIRO, M. **Métodos biotecnológicos aplicados ao melhoramento genético do maracujá**. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.) Maracujá germoplasma e melhoramento genético. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, p. 410-454, 2005.

VIEIRA, M. L. C.; CARNEIRO, M. S. **Passifloraceae *Passiflora* spp. Passionfruit**. In: LITZ, R. (Ed.). Biotechnology of Fruit and Nut Crops. Orfordshire: CAB International, p. 436-453, 2004.

VIEIRA, M. L. C.; DORNELAS, M. C. **Regeneration of plants from protoplasts of *Passiflora* species (Passion Fruit)**. In: Bajaj, Y. P. S. (Ed.). Biotechnology in agriculture and forestry: plant protoplasts and genetic engineering VII. Berlin: Springer Verlag, p. 108-119, 1996.

VIEIRA, G. P.; **Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e alcaloides em folhas e frutos (pericarpo, polpa e sementes) de passifloras spp.** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo. 2013.

YANG, C. S., et al. **Inhibition of carcinogenesis b nhhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds**. Annu. Rev. Nutr. v. 21, p. 381-406, 2001.

ZACARIAS, A. A.; MORESCO, H. H.; HORST, H.; BRIGHENTE, I. M. C.; MARQUES, M. C. A.; PIZZOLLATI, M. G. **Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla***. In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

